Die Aktivitäten von Enzymen des Glykogen- und Trehalosestoffwechsels in den einzelnen Organen des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque und Kontrollmechanismen des Glykogenstoffwechsels im Schwanzmuskel.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helga Jantzen
aus Berlin

1968

Die Aktivitäten von Enzymen des Glykogen- und Trehalosestoffwechsels in den einzelnen Organen des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque und Kontrollmechanismen des Glykogenstoffwechsels im Schwanzmuskel.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helga Jantzen
aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. K. Urich

2. Referent: Prof. Dr. G. Kümmel

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 1967

Tag der Promotion: 6. MAI 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen 1

Einleitung

1 Aufgabe und Problemstellung 2

2 Literaturübersicht, mit besonderer Berücksichtigung der für Arthropoden vorliegenden Arbeiten..... 6

Material und Methode

1 Tiermaterial 12

2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

a Allgemeines zur Methodik der Enzymaktivitätsmessungen 12

b Präparation der Gewebe 13

c Bestimmung der einzelnen Enzyme 13

3 Bestimmung einiger Stoffwechselprodukte im Schwanzmuskel

a Präparation des Gewebes 18

b Bestimmung von Nukleotiden, Pi, G-6-P und Kohlenhydraten 18

4 Bestimmung des intrazellulären Wassers im Schwanzmuskel..... 21

5 Anzahl der Messungen, Statistik, Bestimmung der Michaelis- und Hemmkonstante..... 21

Ergebnisse und Diskussion

1 Glykogenstoffwechsel

a Aktivitätsuntersuchungen der Enzyme der Glykogenese und der Glykogenolyse in den Organen von Orconectes 26

b Monatliche Messungen der Konzentrationen einiger Metabolite im Schwanzmuskel und der Aktivitäten einiger Enzyme im Schwanzmuskel und anderen Organen..... 39

c Nähere Charakterisierung der Enzyme Glykogen-Phosphorylase und Glykogen-Synthetase: In vitro und in vivo Umwandlung der Phosphorylase b in die Phosphorylase a, Aktivierung und Hemmung der Phosphorylase b und Synthetase D durch allo-

sterische Effektoren..... 48
d Beziehung von Glykogenkonzentration und Aktivität der Enzyme Glykogen-Synthetase und -Phosphorylase im Schwanzmuskel..... 61
2 Trehalosestoffwechsel
a Aktivitätsbestimmungen der Enzyme Trehalosephosphat-Synthetase und Trehalase.... 71
b Eigenschaften der Trehalase..... 71
c Orientierende Messungen der Aktivität der Trehalase in einigen Monaten und einigen Organen..... 75
d Bedeutung und Regelung der Trehalosekonzentration im Muskel..... 76
Allgemeine Diskussion..... 79
Zusammenfassung..... 83
Literaturverzeichnis..... 86
Anhang:
a Reaktionsschema von Glykogen- und Trehalosestoffwechsel.
b Lebenslauf

Abkürzungen

AMP	= Adenosin-5'-monophosphat
3'5'-AMP	= zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
EDTA	= Äthylendiamin-tetraessigsäure
F-6-P	= D-Fructose-6-phosphat
GAP	= Glyzerinaldehyd-3-phosphat
G-1-P	= D-Glucose-1-phosphat
G-6-P	= D-Glucose-6-phosphat
NAD^+	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, red.
PEP	= Phosphoenol-pyruvat
3-PG	= 3-Phosphoglycerat
6-PG	= D-6-Phosphogluconat
Pi	= anorganisches Phosphat
PP	= Pyrophosphat
TRA	= Triäthanolamin
Tris	= Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	= Uridin-5'-diphosphat
UDPG	= Uridin-5'-diphospho-glucose
UTP	= Uridin-5'-triphosphat

HIM - Hexosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9 D-Glucose-6-phosphate ketol-isomerase, 1964)

PGM - Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1 α-D-Glucose-1,6-diphosphate: α-D-glucose-1-phosphate phosphotransferase)

Pho - Glykogen-Phosphorylase (EC 2.4.1.1 α-1,4-Glucan: orthophosphate glucosyltransferase)

Pyr - UDPG-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9 UTP: α-D-glucose-1-phosphate uridyltransferase)

Syn- Glykogen-Synthetase (EC 2.4.1.11 UDPglucose: α-1,4-glucan α-4-glucosyltransferase)

- Trehalosephosphat-Synthetase (EC 2.4.1.15 UDPglucose: D-glucose-6-phosphate 1-glucosyltransferase)

- Trehalase (EC 3.2.1.28 Trehalose 1-glucohydrolase)

Einleitung

1 Aufgabe und Problemstellung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Vorgängen des Kohlenhydratstoffwechsels bei einem Vertreter der Crustaceen, dem Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque. KELLER(1964)stellte fest, daß bei Orconectes limosus Glykolyse und Citronensäurezyklus nach dem von Wirbeltieren bekannten Schema ablaufen und offenbar eine ähnliche zentrale Rolle im energieliefernden Stoffwechsel spielen.

Zwei weitere Stoffwechselwege, Glykogenese und Glykogenolyse wurden bisher nur in geringem Umfang bei den Krebsen untersucht. Die nähere Bestimmung der beteiligten Enzyme war eine Aufgabe dieser Arbeit.

Offenbar spielt bei Orconectes neben Glykogen auch Trehalose für den Kohlenhydratstoffwechsel eine Rolle (SPECK 1967). Es war zu prüfen, ob der Trehalose-auf- und abbau ähnlich wie bei den Insekten verläuft (vergl.Anhang).

Im Rahmen eines Arbeitsprogrammes des hiesigen Institutes war es beabsichtigt, an Hand der Enzymaktivitäten als einem Maß der Stoffwechselintensität, die quantitative Bedeutung der Glykogenese, der Glykogenolyse und des Trehalosestoffwechsels in den verschiedenen Organen des Krebses vergleichend zu bestimmen. Die Grundgedanken dieses Programms wurden von URICH (1958, 1961, 1964) und ergänzend von KELLER (1964) erläutert. Um Aussagen darüber machen zu können, in welchem Maß das Produkt der Glykogenolyse, G-1-P, in den einzelnen Organen in die Glykolyse eingeschleust wird, wurden Phosphoglucomutase und Hexosephosphat-Isomerase vergleichend in allen Organen bestimmt.

Wie KELLER (1964) schon feststellte, wird vorausgesetzt, "daß die in vitro unter optimalen Bedingungen gemessenen Umsatzgeschwindigkeiten tatsächlich ein adäquates Maß für die Vorgänge in vivo sind, was nicht

selbstverständlich ist." Die in den letzten Jahren bekanntgewordenen Befunde über besondere kinetische Eigenschaften bestimmter Enzyme und die damit verbundene Schlüsselstellung dieser Enzyme für die Regulation des Stoffwechselflusses, lassen es tatsächlich fraglich erscheinen, ob die Aktivitäten, gemessen unter optimalen Bedingungen, ein angemessenes Maß für die Stoffwechselintensität in vivo sind.

Wichtig in diesem Zusammenhang sind die durch MONOD et al. (1963, 1965) bekanntgewordenen allosterischen Eigenschaften einiger Enzyme. Diese Enzyme werden durch bestimmte Stoffwechselmetabolite so in ihrer Konformation verändert, daß sich die kinetischen Eigenschaften entscheidend ändern. Nach MONOD et al. (1963, 1965) existiert diese Kontrollmöglichkeit für Enzyme, die neben dem aktiven Zentrum (Zentren), das für die Substratbindung verantwortlich ist, im Molekül einen weiteren Ort (Orte), das allosterische Zentrum, besitzen, an den bestimmte Metabolite, die allosterischen Effektoren, gebunden werden können. Der allosterische Effektor wird selbst in der Reaktion nicht gebraucht; er verändert nur die Struktur eines Enzyms so, daß ein allosterischer Aktivator die Affinität des Enzyms zum Substrat steigert, ein allosterischer Inhibitor die Affinität des Enzyms zum Substrat vermindert.

Aus diesem Grund erschien es interessant beim Krebs die Aktivität solcher Enzyme genauer zu untersuchen, denen allosterische Eigenschaften zukommen, um festzustellen, in welchem Maß die unter optimalen Bedingungen gemessene Aktivität durch allosterische Effektoren in vivo verändert wird. Von den hier zur Rede stehenden Enzymen der Glykogenese und der Glykogenolyse boten sich das Enzym Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase aus zwei Gründen an : 1. Die allosterischen Eigenschaften dieser Enzyme sind bei Wirbeltieren recht gut, und auch beim Krebs andeutungsweise, untersucht worden. 2. In älteren (RENAUD 1949)

und neueren (SPECK 1967) Arbeiten sind zyklische Veränderungen der Glykogenkonzentration beim Krebs beschrieben worden. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß der Grund dafür nicht in Veränderungen der Nahrungsaufnahme zu suchen ist. Daher waren Änderungen der Aktivitäten von Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase zu erwarten.

Auf Grund der Eigenschaften dieser Enzyme sind zwei unterschiedliche Kontrollmechanismen der Aktivität denkbar: Kontrolle der Enzymkonzentration, die durch Induktions- und Repressionsphänomene gekennzeichnet ist (JACOB und MONOD 1961, WEBER et al. 1965), also über eine Aktivierung bzw. Inaktivierung der Gentätigkeit verläuft, was Übergangszeiten bis zu mehreren Stunden beanspruchen kann, oder aber eine Kontrolle der Enzymkinetik durch allosterische Effektoren, wobei sehr kurze Übergangszeiten benötigt werden.

Aus praktischen Erwägungen wurde der Schwanzmuskel zur Feststellung der Beziehungen von Glykogenkonzentration und Enzymaktivität gewählt: Die Glykogenkonzentrationen sind hier zwar niedrig im Verhältnis zu denen in anderen Organen des Krebses, zeigen jedoch große jahreszeitliche Unterschiede, die noch gut gemessen werden können. Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase haben in diesem Organ ihre größte spezifische Aktivität und sind im Muskelhomogenat relativ stabil.

Bei den Enzymen Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase unterscheidet man eine sogenannte "aktive" und "inaktive" Form. Die "aktive" Form zeigt Aktivität ohne Zusatz von Aktivatoren, die "inaktive" Form ist nur aktiv unter Zusatz von Aktivatoren. Beide Formen können sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden und sind durch einen enzymkatalysierten Prozeß ineinander umwandelbar.

Bei der Glykogen-Synthetase unterscheidet man die I-Form von der D-Form, letztere nur aktiv unter Zusatz von G-6-P (LELOIR 1959). Bei der Glykogen-Phosphorylase unterscheidet man die a- von der b-Form, letztere nur aktiv unter Zusatz von AMP. Für die Phosphorylase b sind auch Inhibitoren bekannt, wie ATP, ADP, G-6-P

(MORGAN und PARMEGGIANI 1964) und UDPG (MADSEN 1961), die mit dem Aktivator AMP in Konkurrenz treten.

Einige Befunde deuten darauf hin, daß im Wirbeltiermuskel die Effektoren in Konzentrationen vorkommen, die entsprechend den kinetischen Daten der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase für eine Beeinflussung der Aktivität der "inaktiven" Enzymform von Bedeutung sein können (MORGAN und PARMEGGIANI 1964).

Auf Grund dieser, von Wirbeltiersynthetase und -phosphorylase ausreichend bekannten Eigenschaften, sind folgende Kontrollen der Enzymaktivität beim Krebs denkbar:

1) Konzentrationsänderung von Gesamtphosphorylase (Phosphorylase a+b) und Gesamtsynthetase (Synthetase I+D).
2) Umwandlung der "aktiven" in die "inaktive" bzw. der "inaktiven" in die "aktive" Enzymform.
3) Beeinflussung der Aktivität der "inaktiven" Formen durch allosterische Effektoren.

Zur Feststellung einer Aktivitätsänderung der Enzyme im Schwanzmuskel des Krebses waren daher folgende Fragen zu beantworten:

1) Ändert sich die Gesamtaktivität, d.h. ändert sich die Aktivität gemessen unter optimalen Bedingungen im Laufe des Jahres?
2) Können beide Enzyme in einer "aktiven" bzw. "inaktiven" Form vorliegen, d.h. ändert sich die Aktivität bei Zusatz bestimmter Effektoren?
3) In welchen Konzentrationen sind die Effektoren der Synthetase D und der Phosphorylase b wirksam?
4) Kommen die Effektoren in wirksamen Konzentrationen im Schwanzmuskel vor?
5) Ändert sich im Laufe des Jahres die Konzentration der Effektoren?
6) Kommen Formenumwandlungen im Laufe des Jahres vor?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte es ermöglichen, eine Erklärung für die jahreszeitlichen Glykogenschwankungen im Krebsmuskel zu finden. Dabei konnte nicht das Ziel sein, eine genaue quantitative Korrelation von Enzymaktivität und Glykogenkonzentration zu zeigen,

denn auch mit Hilfe dieser zusätzlichen Daten war es nicht möglich, die exakte Aktivität in vivo, zu ermitteln. Es ist nämlich zu bedenken, daß die Zelle kein homogenes System darstellt, sondern in Kompartimente unterteilt ist, so daß die Konzentrationsangaben der Effektoren, die auf das gesamte intrazelluläre Wasser bezogen werden, sicher nicht den in vivo für das Enzym geltenden Konzentrationen entsprechen. Außerdem sollte die Kinetik der Hemmung bzw. der Aktivierung durch allosterische Effektoren nicht am gereinigten Enzym, sondern nur an Rohhomogenaten des Schwanzmuskels ermittelt und auch nur die wichtigsten der bekannten Effektoren untersucht werden.

Aus diesem Grund konnte es höchstens möglich sein, die Tendenzen von Konzentrationsänderungen des Glykogens mit Tendenzen von Enzymaktivitätsänderungen zu vergleichen.

2 Literaturübersicht mit besonderer Berücksichtigung der für Arthropoden vorliegenden Arbeiten.

In diesem Abschnitt soll eine kurze Übersicht der für den Trehalose- und Glykogenstoffwechsel wichtigen Literatur gegeben werden, unter besonderer Berücksichtigung der für Arthropoden gefundenen Tatsachen.

Das Vorkommen von Glykogen beim Krebs ist zum ersten Mal von BERNARD(1879)festgestellt worden. Die Anhäufung von Glykogen in der Mitteldarmdrüse und Hypodermis vor der Häutung und die Abnahme nach der Häutung bei Cancer pagurus (RENAUD 1949) und Panulirus japonicus (SCHWABE und SCHEER 1952), die Tatsache, daß nach Injektion von ^{14}C-markierter Glucose keine Radioaktivität im ausgeatmeten CO_2 bei Panulirus entdeckt werden konnte (SCHEER und SCHEER 1951) und der Befund, daß bei Hemigrapsus nudus im Hunger nur Protein, nicht aber Glykogen abgebaut wird (NEILAND und SCHEER 1953), veranlaßte SCHEER (1957) zu der Ansicht, daß Glykogen nicht wie bei den Wirbeltieren eine Energiequelle darstelle, sondern nur als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese diene.

MEYERHOF und LOHMAN (1928) sowie BOYLAND (1928) hatten jedoch bereits festgestellt, daß in arbeitenden Muskeln von Krebsen Glykogen abgebaut und Lactat angehäuft wird. Die Befunde von HU (1958), von BERGREEN, MEENAKSHI und SCHEER (1961) und KELLER (1964) zeigten dann die Existenz einer funktionierenden Glykolyse, so daß anzunehmen ist, daß das Glykogen der Krebse auch zur Energiegewinnung dient. Nach neueren Untersuchungen (DALL 1965) soll bei der Garnele Metapenaeus nicht Glykogen, sondern ein saures Mucopolysaccharid als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese dienen.

Nachdem LELOIR (1967) gefunden hatte, daß in der Leber der Ratte die Glykogensynthese nicht die Umkehrung des von CORI (1943) entdeckten phosphorolytischen Glykogenabbaus ist, schien es angebracht, den Stoffwechselweg der Glykogenese von dem der Glykogenolyse zu trennen. Die Glucoseübertragung auf das Glykogen erfolgt über den "aktivierten" Zucker UDPG. Das für die Bildung von UDPG verantwortliche Enzym UDPG-Pyrophosphorylase wurde unter anderem bei der Hefe (MUNCH-PETERSEN 1955) und im Skelettmuskel (VILLAR-PALASI und LARNER 1960 a) nachgewiesen. VARDANIS (1963) zeigte im Fettkörper von Periplaneta americana das Vorkommen von UDPG-Pyrophosphorylase.

Mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, daß auch bei Wirbellosen die Glykogensynthese über UDPG mit Hilfe des Enzyms Glykogen-Synthetase erfolgt. Bei einer Heuschrecke (vermutlich Schistocerca cancellata) (TRIVELLONI 1960) und bei der Schabe Periplaneta americana (VARDANIS 1963) konnte Glykogen-Synthetase nachgewiesen werden. Diese Autoren fanden jedoch keine Aktivierung der Glykogen-Synthetase durch G-6-P, wie sie für die Glykogen-Synthetase der Wirbeltiere gezeigt werden konnte (LELOIR 1959). Nach einer neueren Arbeit (MURPHY und WYATT 1965) sind bei der Larve der Seidenraupe Hyalophora cecropia eine G-6-P-unabhängige und eine G-6-P-abhängige Form der Synthetase zu unterscheiden. Im späten fünften Larvenstadium befindet sich die Glykogen-Synthetase im Fettkörper etwa zu 30 % in der I-Form, während in allen anderen Stadien nur die

D-Form vorzuliegen scheint.

Auch für die Krebse Cancer magister, Hemigrapsus nudus und Astacus cambarus konnten WANG und SCHEER (1963), für den Hummermuskel TRAUT und LIPMANN (1963) eine Glykogen-Synthetase nachweisen, die ihre maximale Aktivität erst unter Zusatz von G-6-P erreicht. Außerdem zeigten WANG und SCHEER (1963), daß die Aktivität der Glykogen-Synthetase (gemessen in Gegenwart von G-6-P) durch einen Augenstielfaktor in den einzelnen Häutungsstadien unterschiedlich zu beeinflussen ist. In diesem Institut hat KELLER (1967) bei Orconectes limosus nachgewiesen, daß die Synthetase im Schwanzmuskel in der D- und I-Form vorliegt und, daß nach Augenstielablation zwar die Gesamtaktivität konstant bleibt, jedoch die I-Aktivität zunimmt, was für eine Umwandlung der D- in die I-Form spricht. Diese erfolgt möglicherweise auf Grund hormonaler Einflüsse, ähnlich wie bei Wirbeltieren durch das Hormon Insulin (VILLAR-PALASI und LARNER 1960 b, 1961; STEINER 1961, 1964; WILLIAMS und MAYER 1965; DANFORTH 1965 a).

Das glykogenabbauende Enzym Phosphorylase konnte im Fettkörper der Schabe Periplaneta americana (STEELE 1963) und bei den Seidenraupen Samia cynthia und Hyalophora cecropia (STEVENSON und WYATT 1964), und zwar in der AMP-unabhängigen Form a und in der AMP-abhängigen Form b, nachgewiesen werden. Die Versuche von STEELE(1963) weisen darauf hin, daß eine Umwandlung der b- in die a-Form auf Grund hormonaler Einflüsse erfolgen kann, vergleichbar der Rolle des Adrenalin bei Wirbeltieren (SUTHERLAND 1951, RALL 1958, HELMREICH und CORI 1966, SUTHERLAND 1966).

Im Schwanzmuskel des Hummers wies COWGILL (1955, 1956, 1959) die Phosphorylase a und b nach. Die Versuche von KELLER (1965 b) an Orconectes limosus zeigen, daß unter Einfluß eines Augenstielhormons die beiden Formen der Phosphorylase ineinander umwandelbar sind.

Folgende Befunde weisen also darauf hin, daß die Eigenschaften der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase bei Wirbellosen denen der Wirbeltiere gleichen und daß ähnliche Regulationsmöglichkeiten der Enzymaktivität zu erwarten sind:

1) Vorkommen der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase in einer "inaktiven" und einer "aktiven" Form.
2) Aktivierung der "inaktiven" Form durch allosterische Effektoren.
3) Umwandlung der Formen unter hormonalem Einfluß.

Es liegen aber für Wirbellose noch keine genauen Angaben über die Kinetik der Enzyme vor, besonders im Hinblick auf die Aktivierbarkeit bzw. Hemmbarkeit durch allosterische Effektoren. Auch Angaben über Nukleotid- und G-6-P-Konzentrationen in den Geweben von Arthropoden und deren Veränderbarkeit unter bestimmten Bedingungen liegen nur vereinzelt vor. Bei Locusta haben KIRSTEN et al. (1963) unter anderem ATP, ADP, AMP und G-6-P im Beinmuskel bestimmt. Sie konnten deutliche Unterschiede der Nukleotid- und G-6-P-Konzentration im Muskel nach Ruhe und Sprung aufzeigen. CAREY und WYATT (1963) haben in der Flügelepidermis und im Fettkörper von Hyalophora cecropia ATP-Konzentrationsänderungen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium festgestellt.

Im Froschmuskel verändern sich die Nukleotid- und G-6-P-Konzentrationen nach elektrischer Reizung (HELMREICH und CORI 1965). Adrenalin, Insulin und Sauerstoffmangel bewirken Konzentrationsänderungen der Nukleotide und des G-6-P bei durchströmten Rattenherzen (WILLIAMSON 1965).

Die Konzentrationsveränderungen der Nukleotide und des G-6-P spielen sich in den Geweben von Wirbeltieren in Größenordnungen ab, die nach den kinetischen Daten der Aktivierbarkeit der Phosphorylase b durch AMP und ihre Hemmbarkeit durch ATP (PARMEGGIANI und MORGAN 1962, MORGAN und PARMEGGIANI 1964) und den kinetischen Daten der Aktivierung der Synthetase D durch G-6-P (LELOIR 1959) den Schluß zulassen, daß eine Aktivitätsregelung der "inaktiven" Phosphorylase und der "inaktiven" Synthetase zumindest im Wirbeltiermuskel möglich ist (MORGAN und PARMEGGIANI 1964).

Für die Krebse existieren noch keine brauchbaren Befunde über die Kinetik der Enzyme Glykogen-Phosphorylase und Glykogen-Synthetase und über die Konzentration von Effek-

toren in den Geweben, die eine Aussage über die Beeinflussung der Enzymaktivität in vivo durch Inhibitoren oder Aktivatoren zuließen. COWGILL (1959) hat beim Hummer die Kinetik der Aktivierung der Phosphorylase b durch AMP untersucht. ROBERTSON (1961) hat im Muskel des Hummers Nephrops norvegicus die ATP-, Orthophosphat- und Argininphosphat-Konzentration festgestellt.

Befunde über das Vorkommen von Trehalose bei Krebsen liegen nur vereinzelt vor. Daher sind wohl auch die Enzyme des Trehalosestoffwechsels bei den dekapoden Krebsen noch nicht untersucht worden. FAIRBAIRN (1958) wies bei einigen dekapoden Krebsen Trehalose nach und McWHINNIE und SALLER (1960) vermuteten bei Orconectes virilis das Vorkommen von Trehalose im Blut. DEAN und VERNBERG (1965) zeigten bei Libinia emarginata und anderen dekapoden Krebsen das Vorkommen von Trehalose. SPECK (1967) hat jetzt für Orconectes limosus in der Hämolymphe und in den Geweben, in besonders hoher Konzentration im Schwanzmuskel, Trehalose nachgewiesen und festgestellt, daß die Konzentration im Laufe des Jahres außerordentlich schwankt. Bei dem nicht-dekapoden Krebs Artemia salina wurde Trehalose nur bei den überwinternden Dauereiern festgestellt. CLEGG (1965) sah in einer Trehaloseansammlung gegenüber einer Glykogenansammlung eine günstigere Art der Energiespeicherung bei dem niedrigen Wassergehalt des Embryos. Über die Bedeutung von Trehalose bei dekapoden Krebsen kann an Hand der zitierten Befunde keine Aussage gemacht werden.

Wie die Synthese des Polysaccharides Glykogen, so erfolgt auch die Synthese des Disaccharides Trehalose über den "aktivierten" Zucker UDPG, wie LELOIR und CABIB (1953) erstmals bei der Hefe feststellen konnten.

Nachdem WYATT und KALF (1957) erkannt hatten, daß der Blutzucker der Insekten zur Hauptsache aus Trehalose besteht, wurde bald der Fettkörper der Insekten als Hauptort der Synthese erkannt (CANDY und KILBY 1959), und festgestellt, daß auch hier der Aufbau über UDPG

vermittels des Enzyms Trehalosephosphat-Synthetase erfolgt (TRIVELLONI 1960, CANDY und KILBY 1961, CLEGG 1961). Der Abbau wird durch das Enzym Trehalase katalysiert (KALF und RIEDER 1958, ZEBE 1959, SAITO 1960, SAITO 1963, GUSSIN und WYATT 1965, HANSEN 1966).

Im Fettkörper von Hyalophora besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Glykogen- und der Trehalosesynthese (MURPHY und WYATT 1964, 1965). Beide Synthesen erfolgen über UDPG. Eine ständige Konkurrenz der Trehalosephosphat- und der Glykogen-Synthese wird dadurch vermieden, daß die Michaeliskonstante für UDPG bei der Trehalosephosphat-Synthetase 0,3 mM, bei der Glykogen-Synthetase 1,6 mM beträgt und Trehalose die Trehalosephosphat-Synthetase hemmt. Es wird also zuerst Trehalose synthetisiert, bis diese ihre eigene Synthese hemmt; nun sammelt sich UDPG an und die Glykogensynthese wird verstärkt. Im Stoffwechsel der Insekten spielt die Trehalose sowohl bei der Energiegewinnung (CLEGG 1961, BÜCHER und KLINGENBERG 1958, DUCHÂTEAU-BOSSON et al. 1963) als auch bei der Bereitstellung von Kohlenhydrat für die Chitinsynthese (DUCHÂTEAU-BOSSON et al. 1963, FRIEDMAN 1961) eine Rolle.

Die quantitative Verteilung der Enzyme des Glykogen- und des Trehalosestoffwechsels auf die einzelnen Organe ist bei Insekten und Krebsen noch nicht detailliert untersucht worden. Im Folgenden können daher die Enzymverteilungsmuster von Orconectes meistens nur mit denen von Wirbeltieren verglichen werden.

Material und Methoden

1 Tiermaterial

Objekt dieser Untersuchungen war der Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis Say). Die Tiere stammten aus der Havel bei Berlin-Spandau. Nach dem Fang wurden sie möglichst drei Tage im Keller des Institutes unter fließendem Leitungswasser gehalten, bevor sie zum Versuch verwendet wurden. Dies konnte besonders in den Wintermonaten nicht immer exakt eingehalten werden. Es wurden aber nur männliche Tiere verwendet, die längstens einen Monat gehalten und in der Zeit regelmäßig mit Herzfleisch gefüttert worden waren. Die verwendeten Tiere wogen zwischen 20 und 30 g.

2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

a Allgemeines zur Methodik der Enzymaktivitätsmessungen.

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden zwei Methoden verwandt:

1) Methode des optischen Tests nach WARBURG und CHRISTIAN (1936). Sie ist anzuwenden, wenn die Reaktion mit der Oxydation von NADH und NADPH bzw. mit der Reduktion von NAD^+ und $NADP^+$ gekoppelt ist. Der Reaktionsverlauf wurde bei 366 nm und 25° C im Eppendorf-Photometer (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) gemessen und mittels eines Philips-Kompensationsschreibers mit Linearisierungseinheit (Netheler und Hinz) registriert. Bei 366 nm entspricht einer Extinktionsänderung von 0,100 einem Substratumsatz von 30,3 nMol pro ml Küvetteninhalt und 1 cm Schichtdicke.
2) Konzentrationsbestimmung des bei der Reaktion entstehenden Produktes mittels eines Farbtests anhand einer für das Produkt gefundenen Eichkurve.

Die Enzymaktivität wird angegeben in nMol (10^{-9} Mol) umgesetztes Substrat pro mg Protein und Minute. Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (1951). Die für die Proteinbestimmung benutzte Eichsubstanz war kristallisiertes Serumalbumin vom Rind (Sigma, St.

Louis, Mo. USA).

b Präparation der Gewebe

Zur Tötung wurden die Versuchstiere in Heptan geworfen, das auf minus 70° C gekühlt war, oder 15 Minuten in einer Tiefkühltruhe bei minus 30° C belassen. Das Töten durch Chloroformdämpfe wurde nur bei der Bestimmung der Hexosephosphat-Isomerase-Aktivität angewandt.

Die Organe wurden schnell entnommen und in einem Tris/EDTA-Puffer mittels eines Potter-Elvehjem Homogenisators mit Teflonstempel oder eines Glashomogenisators nach DOUNCE et al. (1955) unter Eiskühlung homogenisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Homogenate bei 20000 g und 4° C zentrifugiert und die Überstände zur Aktivitätsbestimmung verwandt.

Mit Antennendrüse wird der Exkretionsapparat ausschließlich der Harnblase, mit Hypodermis die Auskleidung der die Kiemenhöhle bedeckenden Carapaxhälften bezeichnet. Vom Magen wurden nur die weichhäutigen Teile verwendet. Zur Gewinnung von Blutserum wurden dem Tier vor der Tötung 1 bis 2 Peraeopoden abgeschnitten. Das austropfende Blut wurde in einem eisgekühlten Zentrifugenglas aufgefangen und das sich bildende Gerinnsel abzentrifugiert.

c Bestimmung der einzelnen Enzyme

Die Konzentrationsangaben der Komponenten in den Bestimmungsansätzen bedeuten Endkonzentrationen (mMol/l) .

Pyrophosphorylase

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach MUNCH-PETERSEN (1955). Der optische Test beruht auf folgenden Reaktionen:

1) UDPG + PP → UTP + G-1-P (Pyrophosphorylase)
2) G-1-P → G-6-P (Phosphoglucomutase)
3) G-6-P + $NADP^+$ → 6-PG + NADPH (G-6-P-Dehydrogenase)

Homogenisationsmedium:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) 50; $MgCl_2$ 10; EDTA-Na_2 1.

Bestimmungsansatz:

Tris/HCl-Puffer (pH7) 35; Cystein 1; $MgCl_2$ 9; $NADP^+$ 0,4; UDPG 0,35; $Na_4P_2O_7$ 10; Phosphoglucomutase 5 µl (Boehringer Enzympräparat 2 mg/ml); G-6-P-Dehydrogenase 5 µl

(Boehringer Enzympräparat 1 mg/ml).
Gesamtvolumen: 1 ml

Glykogen-Synthetase

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach LELOIR und GOLDEMBERG (1960). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

1) UDPG + Glykogen(n) → Glykogen(n+1) + UDP (Synthetase)
2) UDP + PEP → UTP + Pyruvat (Pyruvatkinase)

Das Pyruvat wird nach Reaktion mit 2,4 Ninitrophenylhydrazin photometrisch bei 520 nm bestimmt.

Homogenisationsmedium:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50; EDTA-Na_2 5; KF 20.

Bestimmungsansatz:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) 67; Glykogen 0,4 mg im Ansatz; $MgCl_2$ 10; UDPG 5; G-6-P 10(Gesamtaktivität);
Gesamtvolumen: 0,05 ml

Es wurde 15 Minuten bei 25° C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch zwei Minuten langes Eintauchen der abgedeckten Gläser in ein siedendes Wasserbad. Nach Abkühlen im Eisbad wurde zu dem Reaktionsgemisch folgendes hinzugegeben:
0,025 ml Phosphoenolpyruvat (0,01 M PEP in 0,4 M KCL)
0,025 ml Pyruvatkinase (in 0,1 M $MgSO_4$, 5 µg/Ansatz)
Nach Inkubation für 25 Minuten bei 25° C wurde diese Reaktion durch Hinzugeben von
0,15 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,1% in 2 N HCl)
gestoppt. Nach 6 Minuten Reaktionszeit wurden
0,2 ml NaOH (10 N) und
1,1 ml Äthanol (95%) hinzugefügt. Es wurde gut gemischt, einige Zeit bei 0° C gekühlt, dann bei 2000 g 10 Minuten zentrifugiert und die Extinktion bei 520 nm bestimmt.
Die Eichkurve wurde mit UDP gewonnen.
Die Aktivität der G-6-P-abhängigen D-Form ergibt sich als Differenz der I+D -Aktivität und der I-Aktivität.

Trehalosephosphat-Synthetase

Der Bestimmungsansatz wurde nach MURPHY und WYATT (1965) zusammengestellt. Die Bestimmung der Aktivität beruht auf folgenden Reaktionen:

1) UDPG + G-6-P → Trehalose-P + UDP (Trehalose-P-Synthetase)
2) UDP + PEP → UTP + Pyruvat (Pyruvatkinase)

Das Pyruvat wurde nach Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin photometrisch bei 520 nm bestimmt (siehe Aktivitätsbestimmung der Glykogen-Synthetase).

Homogenisationsmedium:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50; EDTA-Na_2 5.

Bestimmungsansatz:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) 67; $MgCl_2$ 10; G-6-P 20; UDPG 5.

Gesamtvolumen: 0,05 ml

Sollten Überstände der bei 20000 g zentrifugierten Homogenate auf Trehalosephosphat-Synthetase getestet werden, wurde die Abnahme von G-6-P bestimmt, denn es konnte nicht unterschieden werden, ob das entstehende UDP auf Grund einer Aktivität der Glykogen-Synthetase oder der Trehalosephosphat-Synthetase frei wurde, da in den Homogenaten genügend Glykogen als "primer" vorhanden war, so daß auch ohne Glykogenzusatz eine Glykogensynthese stattfinden konnte. Der Bestimmungsansatz wurde nach Inkubation (15 bis 60 Minuten, 25°C) mit Äthanol versetzt (80 % Endkonzentration) und das G-6-P im optischen Test bestimmt

UDP-Bestimmung wurde durchgeführt, wenn die Überstände des bei 100000 g zentrifugierten Homogenats benutzt wurden, denn nach Befunden von MURPHY und WYATT (1965) war die Trehalosephosphat-Synthetase im Überstand, die Glykogen-Synthetase im Sediment zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte leider keine bessere Methode (Inkubation mit radioaktiv markiertem G-6-P, Abtrennen der Trehalose und Bestimmen eventuell vorhandener Radioaktivität) angewandt werden.

Glykogen-Phosphorylase

Die Bestimmung der Aktivität der Phosphorylase erfolgte nach SCHMID, ROBBINS und TRAUT (1959). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

1) Glykogen(n) + Pi → Glykogen(n-1) + G-1-P (Phosphorylase)
2) G-1-P → G-6-P (Phosphoglucomutase)
3) G-6-P + $NADP^+$ → 6-PG + NADPH (G-6-P-Dehydrogenase)

Homogenisationsmedium:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50; EDTA-Na_2 5; KF 20.

Bestimmungsansatz:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) 45; $MgCl_2$ 10; Cystein 5; $NADP^+$ 0,4; Glykogen 4 mg/ml Testansatz; Phosphoglucomutase 5 µl (Boehringer Enzympräparat 2mg/ml); NaH_2PO_4 5; AMP 5 (Gesamtaktivität); G-6-P-Dehydrogenase 5 µl (1mg/ml).

Gesamtvolumen: 1,01 ml

Die Reaktion wurde durch Phosphatzugabe gestartet und ca. 3 Minuten registriert (Phosphorylase a). Danach wurde AMP zugegeben und erneut 3 Minuten registriert (Gesamtphosphorylase = Phosphorylase a + b). Die Aktivität der Phosphorylase b ergibt sich als Differenz der Gesamtphosphorylase und der Phosphorylase a.

Phosphoglucomutase

Die Bestimmung der Phosphoglucomutase-Aktivität erfolgte nach KELLER (1965 a). Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

1) G-1-P → G-6-P (Phosphoglucomutase)
2) G-6-P + $NADP^+$ → 6-PG + NADPH (G-6-P-Dehydrogenase)

Homogenisationsmedium:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,8) 50; EDTA-Na_2 5.

Bestimmungsansatz:

Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) 45; Cystein 10; $NADP^+$ 0,2; G-6-P-Dehydrogenase 5 µl (Boehringer Enzympräparat 1 mg/ml); $MgCl_2$ 10; G-1-P 5.

Gesamtvolumen 1 ml

Hexosephosphat-Isomerase

Die Bestimmung der Aktivität der Hexosephosphat-Isomerase erfolgte nach STEIN (1955). Sie beruht auf folgender

Reaktion:
1) G-6-P → F-6-P (Hexosephosphat-Isomerase)
F-6-P wird nach Reaktion mit Resorcin photometrisch bestimmt.
Homogenisationsmedium:
Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) 50; EDTA-Na_2 5.
Bestimmungansatz:
Tris/HCL-Puffer (pH 9) 50; G-6-P 24.
Gesamtvolumen: 0,5 ml
Nach Inkubation für 4 Minuten bei 25° C wurde die Reaktion durch folgende Zugaben gestoppt:
3,5 ml HCl (8,3 M)
1,0 ml Resorcin (1% in 95% Äthanol)
Anschließend wurde 10 Minuten in einem 80 C Wasserbad erhitzt und danach 30 Minuten im kalten Wasserbad belassen. Die Extinktion wurde bei 546 nm am Photometer-Eppendorf abgelesen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve für F-6-P.

Trehalase

Die Bestimmung der Aktivität der Trehalase beruht auf folgenden Reaktionen:
1) Trehalose + H_2O → 2 Glucose (Trehalase)
Die Bestimmung der Glucose erfolgte mit Hilfe einer Testkombination von Boehringer (Enzymatische Bestimmung, GOD/POD-Methode, der wahren Glucose im Blut, Serum und Liquor), die auf folgendem Prinzip beruht:
2) Glucose + H_2O + O_2 → Gluconsäure + H_2O_2 (Glucose Oxydase)
3) H_2O_2 + DH → 2 H_2O + D (Peroxydase).
Hierbei ist DH ein Wasserstoffdonator, o-Dianisidin, der in reduzierter Form farblos, in oxydierter Form braun ist und mit H_2SO_4 eine rote Farbe ergibt. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 546 nm.
Homogenisationsmedium:
EDTA-Na_2 5.
Die Aktivitätsbestimmung erfolgte an nicht zentrifugierten Vollhomogenaten.
Bestimmungsansatz:
Na_2HPO_4 -Puffer (pH 5,7) 30; Trehalose 10.
Gesamtvolumen: 0,1 ml

Es wurde 15 oder 30 Minuten bei 25°C inkubiert, die Reaktion mit 0,1 ml einer 0,6 molaren Perchlorsäure gestoppt, 15 Minuten im Eisbad gekühlt und anschließend zentrifugiert (2000 g, 5Minuten). An 0,05 ml Überstand erfolgte die Bestimmung der Glucose.

Maltase

Homogenisieren und Aktivitätsbestimmung erfolgte wie bei der Trehalase.
Bestimmungsansatz:
Na_2HPO_4-Puffer (pH 5,7) 30; Maltose 10.

3 Bestimmung einiger Stoffwechselprodukte im Schwanzmuskel.

a Präparation des Gewebes.
Die Krebse wurden in Heptan von -70°C getötet, der Muskel schnell herauspräpariert und sofort in Heptan von -70°C gefroren, anschließend gewogen und sofort in 0,3 molarer Perchlorsäure (etwa 1g Muskel/6 ml $HClO_4$) mit dem Atom-Mix-Mill homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert und das Filtrat mit den für die verschiedenen Bestimmungen verwendeten Puffern neutralisiert. Zur Orthophosphatbestimmung wurde ein Teil des Filtrats mit $KHCO_3$neutralisiert.

b Bestimmung von Nukleotiden, G-6-P, Pi und Kohlenhydrat.
ADP, AMP:
Die Bestimmung der Adenosin-5'-Diphosphorsäure und die Bestimmung der Adenosin-5'-Monophosphorsäure erfolgte mit Hilfe einer Testkombination von Boehringer (Enzymatische Bestimmung von ADP und AMP im Blut). Das Muskelfiltrat wurde mit einem TRA/K_2CO_3-Puffer versetzt, ca. 30 Minuten bei 0°C belassen und das ausfallende $KClO_4$ abzentrifugiert. Im Überstand wurden ADP und AMP bestimmt. Folgende Reaktionen liegen der Bestimmung zugrunde:
1) ADP + PEP → ATP + Pyruvat (Pyruvatkinase)
2) Pyruvat + NADH → Lactat + NAD^+ (Lactatdehydrogenase)
Der Verbrauch von NADH wurde bei 366 nm im Photometer-

Eppendorf bis zum Stillstand der Reaktion verfolgt. Danach wurde in der gleichen Küvette AMP durch Zugabe von Myokinase bestimmt. Hierbei wird folgende Reaktion katalysiert:

3) AMP + ATP → 2 ADP (Myokinase)

Das entstehende ADP wird in die Reaktion 1) und 2) eingeschleust. Von dem Verbrauch der NADH -Menge kann auf die AMP-Menge geschlossen werden, wobei 2 Mol NADH einem Mol AMP entsprechen. Eine Extinktionsdifferenz von 0,100 entspricht 30,3 nMol ADP oder 15,15 nMol AMP/ml Küvettenvolumen, bei 1 cm Schichtdicke.

G-6-P:

Zur Bestimmung des G-6-P wurde das Muskelfiltrat mit einem TRA/K_2CO_3 -Puffer versetzt, ca. 30 Minuten bei 0 C belassen und das ausfallende $KClO_4$ abzentrifugiert. Im Überstand wurde G-6-P aufgrund folgender Reaktion bestimmt:

G-6-P + $NADP^+$ → 6-PG + NADPH (G-6-P-Dehydrogenase)

Bestimmungsansatz:

1 ml Überstand
0,01 ml $MgCl_2$ (10 mM)
0,005 ml $NADP^+$ (0,2 mM)
0,005 ml G-6-P-Dehydrogenase (Boehringer Enzympräparat 1 mg/ ml)

ATP:

Das Muskelfiltrat wurde mit dem Puffer TRA/3-PG/$MgSO_4$ einer Testkombination von Boehringer (Bestimmung von ATP im Blut) versetzt und die Bestimmung erfolgte nach den Angaben von Boehringer. Sie beruht auf folgenden Reaktionen:

1) ATP + 3-PG → 1,3-PG-P + ADP (Phosphoglycerat-Kinase)
2) 1,3-PG-P + NADH → GAP + Pi + NAD^+ (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

Orthophosphat:

Die Bestimmung des anorganischen Orthophosphats erfolgte nach den Angaben von SARAYDARIAN et al. (1961). Aus dem neutralisierten Muskelfiltrat wurde das Orthophosphat mit Calciumhydroxyd ausgefällt und der Niederschlag in 0,25 N HCl gelöst. Die Bestimmung des Phosphats erfolgte nach FISKE und SUBBAROW (1925).

Bestimmungsansatz:
2 ml Filtrat ($KClO_4$ wurde mit $KHCO_3$ ausgefällt und mit 0,1 N NaOH auf pH 8,5 (Phenolphthalein) eingestellt)
0,5 ml $Ca(OH)_2$ (1 g $Ca(OH)_2$ wurde in einer 1% $CaCl_2$ - Lösung suspendiert, geschüttelt, gefiltert)
0,2 ml $NaHCO_3$ (0,05 M)
0,3 ml H_2O
Über Nacht bildete sich ein feiner Niederschlag, der mit 2 ml eines mit $Ca(OH)_2$ gesättigten 10% Athanol gespült wurde, ohne daß der Niederschlag aufwirbelte. Der Niederschlag wurde in 1 ml 0,25 N HCl gelöst.

ATP, ADP, AMP, G-6-P und Pi wurden bezogen auf das intrazelluläre Wasser des Muskels. Die Konzentrationsangaben erfolgen in mMol/l.

Polysaccharid und "lösliches" Kohlenhydrat:
Bei der Konzentrationsbestimmung der Kohlenhydrate im Schwanzmuskel wurde ausgegangen von den gleichen, bei 20000 g zentrifugierten Homogenaten, die zur Aktivitätsbestimmung der Glykogen-Phosphorylase und der Glykogen-Synthetase dienten.
1 ml Extrakt wurde mit 0,5 ml 15% Trichloressigsäure versetzt und ca. eine Stunde bei 0°C belassen. Nach Zentrifugieren wurden 1 ml des Überstandes mit 4 ml Athanol versetzt und über Nacht stehen gelassen. Das ausgefällte Polysaccharid wurde abzentrifugiert, in 1 ml Wasser gelöst, mit 2 ml Anthron (0,2% in konz. Schwefelsäure) versetzt und 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, anschließend abgekühlt und die Extinktion bei 650 nm bestimmt. Mit 1 ml des Überstandes wurde ebenso verfahren, um die Konzentration der nicht fällbaren Oligo-Di- und Monosaccharide festzustellen. Als Testsubstanz diente in beiden Fällen Glucose. Es erschien sinnvoll, in diesem Fall, auf Protein des zentrifugierten Homogenats zu beziehen, da auch die Enzymaktivitäten auf das Protein im 20000 g-Überstand bezogen wurden. Die Konzentrationsangaben erfolgten in µg Glucose Äquivalente/mg Protein.

Glucose:
Zur Glucosebestimmung wurden 0,1 ml des 20000 g-Überstandes des Muskelhomogenats mit 0,1 ml Perchlorsäure (0,6 M)

versetzt, das Protein abzentrifugiert und die Glucose im Überstand mit Hilfe einer Testkombination von Boehringer bestimmt (s.Seite 17).

4 Bestimmung des intrazellulären Wassers im Schwanzmuskel.

Das intrazelluläre Wasser ergibt sich als Differenz des gesamten und des extrazellulären Muskelwassers. Zur Bestimmung des gesamten Muskelwassers wurde der herauspräparierte Muskel auf Filterpapier abgetupft, 24 Stunden bei 100°C im Trockenschrank belassen und anschließend zur Trockengewichtsbestimmung gewogen. Zur Bestimmung des extrazellulären Raumes wurde nach der Methode vorgegangen, mit der NARAHARA et al. (1960) das extrazelluläre Volumen von Rattendiaphragmen bestimmt hatten. Der Muskel wurde herauspräpariert, auf Filterpapier abgetupft und längsgeteilt. Beide Hälften wurden getrennt untersucht. Je eine Hälfte wurde 30 Minuten in 10 ml einer Harreveld[1]-Raffinose-Lösung (426 mg Raffinose/100 ml Harreveld) belassen, herausgenommen, auf Filterpapierabgetupft, einmal 10 Minuten mit 2 ml Harreveld und zweimal mit je 1 ml Harreveld 10 Minuten gewaschen. Die Waschwasser wurden zusammengegeben. Die ausgewaschene Raffinose wurde mit Resorcin bestimmt (s. Aktivitätsbestimmung der Hexosephosphat-Isomerase).

5 Anzahl der Messungen, Statistik, Michaelis- und Hemmkonstante.

Bei den Aktivitätsmessungen der Enzyme wurden in der Regel drei unabhängige Bestimmungen an drei Versuchstieren ausgeführt. Bei der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase, bei Glykogen, den nicht durch Äthanol

---

[1] Blutersatzflüssigkeit nach VAN HARREVELD (1936)

fällbaren Kohlenhydraten und Glucose im Muskel wurden unabhängige Bestimmungen durchschnittlich an 8, mindestens jedoch an 5 Tieren durchgeführt, damit eine statistische Abgrenzung der Werte von Monat zu Monat möglich war. Für jede Bestimmung der Nukleotid-, der G-6-P- und der Phosphatkonzentration im Muskel wurden in der Regel ebenfalls 3 Versuchstiere verwandt. Die Konzentrationen der Metabolite wurden grundsätzlich in Doppelbestimmungen festgestellt, ebenso die Enzyme, die nicht mit dem Verfahren des optischen Tests gemessen werden konnten, also Glykogen-Synthetase, Hexosephosphat-Isomerase, Trehalase und Maltase.
Angegeben und tabelliert wurden die Mittelwerte der Messungen: 1)

$$\bar{x} = \frac{S\ x_i}{N}$$

und die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert:

$$s = \sqrt{\frac{S\ (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Zum statistischen Vergleich zweier Meßreihen (z.B. Vergleich von Glykogendurchschnitten zweier Monate) wurde das t-Verfahren angewandt. Es gestattet auch bei kleinem Umfang der Meßreihen, wie es hier der Fall ist, eine exakte Beurteilung (BELITZ 1960). Allerdings muß die Voraussetzung erfüllt sein, daß die Werte normalverteilt sind. Nun sind aber gerade in der Biologie und der Medizin die Häufigkeitsverteilungen fast in allen Fällen mehr oder weniger stark unsymmetrisch, da im biologischen Geschehen nicht das additive, sondern das multiplikative Prinzip im Vordergrund steht (GEBELEIN und HEITE 1951), d.h. die Wirkungen der einzelnen Einflußfaktoren addieren sich nicht, sondern die Wirkung jedes Einflußfaktors ist proportional zu dem bereits erreichten Wert eines Merkmals.

---

1) Erklärung der in den Formeln benutzten Zeichen:
S = Summe
x_i = Einzelwerte
N = Anzahl der Werte

Relevante Abweichungen von der Normalverteilung erhält man dann, wenn die Variable nach unten durch den Wert 0 begrenzt ist und einen großen Variationskoeffizienten aufweist, d.h. wenn $s/\bar{x} > 1/3$ (PFANZAGL 1966).
Da diese Kriterien für die Phosphorylase a, die Synthetase I, das Glykogen, das lösliche Kohlenhydrat und die Glucose zutreffen, mußte geprüft werden, ob durch logarithmische Transformation eine Normalverteilung erhalten wurde. Da nicht genug Werte vorlagen, konnte der hierfür notwendige Anpassungstest (MÜNZNER und SCHÖNFELD 1964) nicht durchgeführt werden. Statt dessen wurde ein graphischer Test unter Verwendung von Wahrscheinlichkeitspapier angewandt (PFANZAGL 19 66). Danach schien es angebracht, zum statistischen Vergleich der Mittelwerte in den einzelnen Monaten im t-Test mit den Logarithmen der Werte zu rechnen, obwohl durch das graphische Prüfverfahren bei der geringen Anzahl der Messungen nicht eindeutig bewiesen werden konnte, daß durch Logarithmieren der Werte eine exakte Normalverteilung erzielt wurde. Da aber nach PFANZAGL (1966) der t-Test robust ist gegen Abweichungen von der Normalverteilung, mögen die errechneten p-Werte doch als statistisch verwendbar anzusehen sein.
Zum Vergleich zweier Meßreihen errechnet sich t nach:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

wobei s, die Streuung der beiden Meßreihen, berechnet wird nach:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \left[S\,(x_i - \bar{x})^2 + S\,(y_i - \bar{y})^2 \right]}$$

Der Freiheitsgrad ist $N_1 + N_2 - 2$ (LINDER 1960).
Diese Formeln sind jedoch nur anzuwenden, wenn die Varianzen nicht signifikant voneinander abweichen.
Da die Prüfung mit dem F-Test (s_1^2/s_2^2 ist mit N-1 und N-2 Freiheitsgraden F-verteilt) eine ungleiche Varianz zeigte, mußte t auch berechnet werden nach:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Der Freiheitsgrad ist:

$$\frac{1}{\frac{c^2}{N_1 - 1} + \frac{(1-c)^2}{N_2 - 1}} \qquad \text{wobei} \qquad c = \frac{\frac{s_1^2}{N_1}}{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}$$

Die zugehörigen p-Werte der errechneten t-Werte wurden aus den graphischen Tafeln von Pätau, veröffentlicht in Belitz (1960), entnommen.

Die Abhängigkeit zweier zufälliger Variabler wurde mit einer Korrelationsanalyse festgestellt. Das Maß für die Straffheit eines Zusammenhanges zufälliger Variabler wird durch den Korrelationseffizienten angegeben, der sich ergibt aus:

$$r = \frac{S\,(x_i - \bar{x})\,(y_i - \bar{y})}{\sqrt{S\,(x_i - \bar{x})^2 \cdot S\,(y_i - \bar{y})^2}}$$

Bei r=1 besteht strenge lineare Beziehung zwischen den Variablen, bei r=0 sind die Variablen unabhängig voneinander. Zur Prüfung von r wurden die Tabellen in WEBER (1961) benutzt.

Die beiden Gleichungen der Regressionsgeraden wurden berechnet nach:

$$Y = \bar{y} + R_{y/x}(X - \bar{x})$$

$$X = \bar{x} + R_{x/y}(Y - \bar{y})$$

wobei $R_{y/x}$ der Regressionskoeffizient von y bezüglich x und $R_{x/y}$ der Regressionskoeffizient von x bezüglich y ist. Sie werden berechnet nach:

$$R_{y/x} = \frac{S\,(x_i - \bar{x})\,(y_i - \bar{y})}{S\,(x_i - \bar{x})^2}$$

$$R_{x/y} = \frac{S\,(x_i - \bar{x})\,(y_i - \bar{y})}{S\,(y_i - \bar{y})^2}$$

Zum Vergleich von Regressionskoeffizienten wurde ein t-Test angewandt. Nach WEBER (1961) ist die Größe

$$\frac{R_{1y/x} - R_{2y/x}}{s}$$

mit N_1+N_2-4 Freiheitsgraden t-verteilt. Dabei ist

$$s = \sqrt{\frac{S\,(y'_i-Y'_i)^2 + S\,(y''_i-Y''_i)^2}{N_1+N_2-4} \left[\frac{1}{S\,(x'_i-\bar{x})^2} + \frac{1}{S\,(x''_i-\bar{x})^2}\right]}$$

und $$S\,(y_i-Y_i)^2 = S\,(y_i-\bar{y})^2 - \frac{\left[S\,(x_i-\bar{x})\,(y_i-\bar{y})\right]}{S\,(x_i-\bar{x})^2}$$

Die Prüfung des Mittelwertes einer Normalverteilung auf einen bestimmten Wert μ_o erfolgte mit Hilfe der Größe

$$\frac{\bar{x} - \mu_o}{s}\sqrt{N-1}$$

die bei $N<120$ mit N-1 Freiheitsgraden t-verteilt ist (MÜNZNER und SCHÖNFELD 1964).

Michaeliskonstante, Km

Die Bestimmung der Michaeliskonstante erfolgte nach der Methode von LINEWEAVER und BURK (1934). Hierzu wurden die reziproken Werte der Geschwindigkeit v und die entsprechenden reziproken Werte der Substratkonzentration s in einem Koordinatensystem, in dem 1/v die Y-Achse und 1/s die X-Achse darstellt, eingezeichnet. Die sich ergebende Gerade schneidet die 1/s-Achse im Punkt -1/Km, gemäß der Gleichung $1/v = Km/V \cdot 1/s + 1/V$.

Hemmkonstante, Ki

Die Bestimmung der Hemmkonstante erfolgte nach DIXON und WEBB (1964). Die Wertepaare werden im 1/v (Y-Achse) und s (X-Achse) Koordinatensystem eingetragen. Die Gerade, gemäß $1/v = 1/V + s/Ki \cdot V$, schneidet die s-Achse im Punkt -ki.

Ergebnisse und Diskussion

1 Glykogenstoffwechsel

a Aktivitätsuntersuchungen der Enzyme der Glykogenese und der Glykogenolyse in den Organen von Orconectes.

In Tabelle 1 sind die Aktivitäten (nMol umgesetztes Substrat/mg Protein·min) der Enzyme UDPG-Pyrophosphorylase, Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase und zusätzlich die Aktivitäten des von KELLER (1964) untersuchten Enzyms Aldolase aufgeführt. In der Tabelle wird durch einen Strich angedeutet, daß die zweifelsohne vorhandene Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase, der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase in der Mitteldarmdrüse nicht bestimmt werden konnte. Anscheinend werden die Enzyme schon beim Homogenisieren durch proteolytische Wirkung zerstört, so daß auch bei sehr schnellem Arbeiten keine Aktivität gefunden werden konnte. Die Angaben für Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase bedeuten Gesamtaktivitäten, also Phosphorylase a + b (Bestimmung unter Zusatz von AMP) und Synthetase I + D (Bestimmung unter Zusatz von G-6-P).

In Abbildung 1 sind die Aktivitäten im logarithmischen Maßstab dargestellt. Aus dieser Darstellung wird klar, daß sich fünf der aufgestellten Enzyme, nämlich Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase und Aldolase in den einzelnen Organen zwar in ihren Absolutaktivitäten unterscheiden, daß aber die Verhältnisse der Enzymaktivitäten zueinander annähernd konstant sind, d.h. diese Enzyme haben das gleiche Verteilungsmuster. Die Pyrophosphorylase hat ein davon abweichendes Verteilungsmuster.

Zur Sicherung der Proportionalität der fünf Enzyme wurden die Organe entsprechend der Summe der fünf Enzymaktivitäten pro Organ aneinander gereiht. Abbildung 1 zeigt den geradlinigen Abfall bzw. Anstieg der Aktivitäten von Organ zu Organ (logarithmischer Maßstab!).

Für jedes Enzym wurden die Logarithmen der Aktivitäten in den Organen mit den Plätzen, den diese Organe in Bezug auf die Gesamtaktivität einnehmen, korreliert. (Platz 1: Muskel, 2: Cerebralganglion, 3: Herz, 4: Antennendrüse, 5: Enddarm, 6: Hypodermis, 7: Hoden, 8: Mitteldarmdrüse, 9: Magen, 10: Kiemen). Es ergaben sich Regressionsgeraden, die sich in ihren Steigungen (Regressionskoeffizient Ry/x) nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$).

Hexosephosphat-Isomerase : $Y = 3,6759 - 0,16X$
$Ry/x = - 0,16$
$r = -0,979$

Phosphoglucomutase : $Y = 2,8885 - 0,12X$
$Ry/x = - 0,12$
$r = - 0,970$

Aldolase : $Y = 2,6195 - 0,17X$
$Ry/x = - 0,17$
$r = - 0,916$

Glykogen-Phosphorylase : $Y = 2,021 - 0,13X$
$Ry/x = - 0,13$
$r = - 0,865$

Glykogen-Synthetase : $Y = 1,674 - 0,15X$
$Ry/x = - 0,15$
$r = - 0,897$

Alle Korrelationskoeffizienten sind mit $p < 0,01$ von 0 verschieden.

Abbildung 1 spiegelt die Reihenfolge der Organe hinsichtlich der Konzentration der Enzyme wider. Dabei ist zu beachten, daß in diesem Fall die Bezugsbasis mg Protein war. Bei einer anderen Bezugsbasis, etwa g Frischgewicht, würde sich eine andere Reihenfolge ergeben, wie Tabelle 4 zeigt. Doch verallgemeinernd kann man sagen, daß die Konzentrationen der Enzyme des Glykogenstoffwechsels in den Organen Schwanzmuskel, Cerebralganglion, Herz, Darm und Antennendrüse höher ist als in den Organen Mitteldarmdrüse, Magen und Kiemen und, daß die Organe mit der höchsten und der niedrigsten

	Mitteldarmdr.	Antennendr.	Kiemen	Hypodermis	Blutserum	Enddarm	Magen	Schwanzmuskel	Herz	Hoden	Cerebralganglion
UDPG-Pyrophosphorylase	——	123,6 15,2	3,1 0,3	14,3 10,0	0	79 12,4	44,7 13,7	26,7 7,0	426,4 39,2		30,5 5,2
Glykogen-Synthetase (I+D)	——	10,2 3,3	0,8 0,7			18,2 7,3	2,5 1,9	53,3 8,2	22,1 11,4		7,6 3,9
Glykogen-Phosphorylase (a+b)	——	16,7 2,2	4,1 0,2	9,3 1,8		27,4 4,8	11,1 6,1	109 15,1	55,3 18,4	16,3 7,5	66,3 12
Phosphoglucomutase	72,1 10,0	175,6 18,0	67,0 14,5	109,3 50,0		180,6 42,0	92,1 41,0	877,3 287	402,6 81,6	92,3 55	379 157
Hexosephosphat-Isomerase	228 63	1403 166	152 72	486 280	52 8	1010 260	122 44	3790 117	1220 230	376 114	1797 115
Aldolase 1)	13,9	85,0 18,1	11,6 3,0	19,2 9,0	0,5 0,3		28,2 5,1	422 73,5	178 18	11,8 2,4	179 17,3
UDPG-Pyrophosphorylase		9	2	3		9	37	1	35		2
Glykogen-Synthetase (I+D)		1	1			2	2	1	2		1
Glykogen-Phosphorylase (a+b		1	3	2		3	9	3	5	4	4
Phosphoglucomutase	32	13	44	44		18	75	26	33	25	21
Hexosephosphat-Isomerase	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100
Aldolase 1)	6	6	8	4		6	1	11	15	3	10

Tab. 1 Enzymaktivitäten in den Organen des Krebses. Oben: absolute Aktivitäten (nMol/mgProtein·min). Unten: relative Aktivitäten+ 1) KELLER (1964)
Die Anzahl der Bestimmungen pro Enzym und Organ betrug zwischen N=3 und N=6. Die obere Zahl gibt das arithmetische Mittel $\bar{x}$ an, die untere die mittlere quadratische Abweichung s.
+Die Aktivitäten wurden auf die gleich 100 gesetzte Aktivität der Hexosephosphat-Isomerase bezogen.

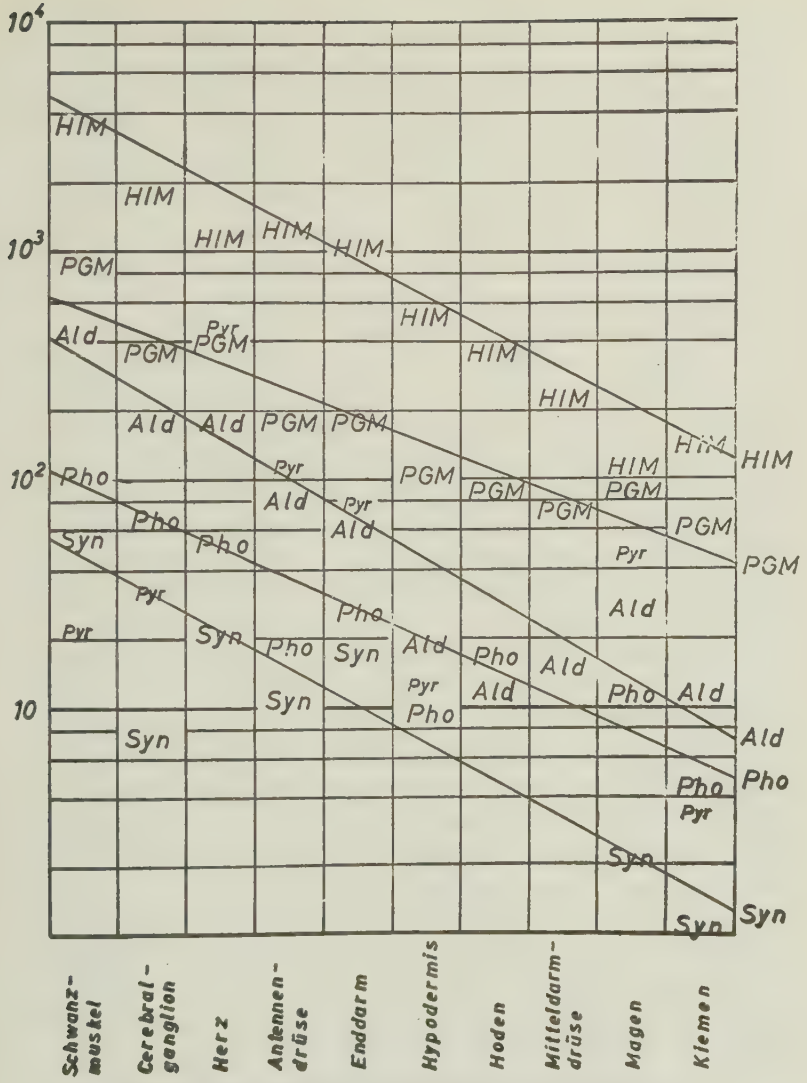


Abb. 1 Enzymaktivitäten in den Organen des Flußkrebses (nMol/mg Protein·min).
HIM-Hexosephosphat-Isomerase, PGM-Phosphoglucomutase, Ald-Aldolase (KELLER 1964), Pho-Phosphorylase (a+b), Syn-Synthetase (I+D), Pyr-UDPG-Pyrophosphorylase

Konzentration sich etwa um den Faktor 30 unterscheiden.

In Tabelle 1 wird die Proportionskonstanz nocheinmal mit Hilfe der relativen Aktivitäten gezeigt. Hierzu wurde die Aktivität der Hexosephosphat-Isomerase in jedem Organ gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der anderen Enzyme darauf bezogen. Hexosephosphat-Isomerase, Phosphoglucomutase, Aldolase, Phosphorylase und Synthetase stehen in allen Organen in einem durchschnittlichen Aktivitätsverhältnis von 100 : 31 : 7 : 4 : 1.

Es ist bemerkenswert, daß gerade das Enzym, das diesen Stoffwechselabschnitt einleitet, die UDPG-Pyrophosphorylase, aus dieser Proportionskonstanz völlig herausfällt. Auch ist erstaunlich, daß sich dieses Enzym zwar nicht in allen Organen, jedoch in den Organen Antennendrüse, Enddarm, Magen, Schwanzmuskel, Herz und Cerebralganglion in etwa konstanten Proportionen zu den von KELLER (1964) untersuchten Enzymen des Citronensäurezyklus verhält. Diese Tatsache ist aus Tabelle 2 zu entnehmen. Hier wurde die Aktivität der Enzyme in den Organen auf die gleich 100 gesetzte Aktivität des Organs mit der höchsten Aktivität bezogen. Die Enzyme UDPG-Pyrophosphorylase, "condensing enzyme", Isocitratdehydrogenase und Malatdehydrogenase haben alle ihre höchste Aktivität im Herz. Für die fünf Enzyme Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase und Aldolase ist aber der Schwanzmuskel das Organ mit der höchsten Aktivität.

Ein Vergleich dieser Enzymaktivitäten mit denen der Wirbeltiere sollte zeigen, ob dieser Befund ein Spezialfall bei Orconectes ist, oder ob sich auch bei Wirbeltieren die UDPG-Pyrophosphorylase nicht in das Aktivitätsmuster der anderen Enzyme einreihen läßt.

Leider konnte keine Arbeit gefunden werden, in der gemeinsam die Enzyme UDPG-Pyrophosphorylase, Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase der Ratte in verschiedenen Organen bestimmt wurden. So mußten drei verschiedene Arbeiten (Glykogen-Synthetase: LELOIR (1959), UDPG-

	Mitteldarmdrüse	Antennendrüse	Kiemen	Hypodermis	Enddarm	Magen	Schwanzmuskel	Herz	Hoden	Cerebralganglion
Glykogen-Synthetase		19			32	5	100	42		14
Glykogen-Phosphorylase		15	4	9	25	10	100	51	15	61
Phosphoglucomutase	8	20	8	11	21	10	100	46	11	43
Hexosephosphat-Isomerase	6	37	4	13	27	3	100	32	10	47
Aldolase 1)	3	20	5	5	14	7	100	43	5	42
UDPG-Pyrophosphorylase		29	1	3	19	11	6	100		13
"condensing enzyme" 1)	8	25	32	14	20	16	3	100	3	7
Isocitratdehydrogenase 1)	9	39	17	14	32	15	12	100	14	23
Malatdehydrogenase 1)	7	23	12	9	27	19	10	100	11	24

Tab. 2 Relative Aktivitäten einiger Enzyme. Die Aktivitäten (nMol/mg Protein·min) in den Organen wurden auf die gleich 100 gesetzte Aktivität des Organs mit der höchsten Aktivität bezogen.
1) Vergleichend hinzugefügt wurden die relativen Aktivitäten der von KELLER (1964) untersuchten Enzyme.

	UDPG-Pyro-phosphoryl.		Glykogen-Synthetase		Glykogen-Phosphoryl.		Phosphoglu-comutase		Hexoseph.-Isomerase		Glykogen			
	O.	R.2)	O.	R.1)	O.	R.2)	O.	R.2)	O.	R.3)	O.4)	R.2)		
MD. Leber	(120)	3540	(10)	187	(20)	300	260	2240	819	960	Nov. 16	Apr. 1,5	gefütt. 2o,2	gefast. 1,4
AD Niere	267	203	22	31	36	31	379	506	3028	1200	7,8	o,4	0,9	0,5
SM Muskel	75	640	150	220	307	1820	2465	6670	10676	1860	2,2	0,2	4,0	1,9
Herz	1278	227	66	166	166	144	1208	600	3660	1080	57,1	6,2	1,7	0,7
CG Gehirn	28	88	7	32	60	38	341	216	1616	780	7,1	1,7	2,0	1,6
Summe	1768	4698	255	636	589	2333	4653	10232	19799	588o	90,2	10	28,7	6,1
Durchschn.	354	940	51	127	118	467	931	2046	3960	1176	18	2	5,7	1,2
Akt.Ratte/ Akt.Krebs	2,7		2,5		4,0		2,2		0,3					

Tab. 3 Enzymaktivitäten (µMol/g F.G.·h) und Glykogenkonzentrationen (mg Glucoseäquivalente/g F.G.) bei Ratte und Krebs. Eingeklammerte Werte sind geschätzt (siehe Text).
Literatur : 1) LELOIR (1959), 2) VILLAR-PALASI und LARNER (1960), 3) FELLENBERG et al. (1962) 4) SPECK (1967)
Abkürzungen : O. - Orconectes, R. - Ratte, MD - Mitteldarmdrüse, AD - Antennendrüse, SM - Schwanzmuskel, CG - Cerebralganglion

Pyrophosphorylase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase: VILLAR-PALASI und LARNER (1960 c), Hexosephosphat-Isomerase: FELLENBERG et al.(1962)) vergleichend herangezogen werden.

Der Vergleich von Krebs- und Rattenenzym erfolgte an Aktivitäten in den Organen Schwanzmuskel (Skelettmuskel), Herz, Cerebralganglion (Gehirn), Antennendrüse (Niere) und Mitteldarmdrüse (Leber). Zu diesem Zweck wurden die Werte dieser Arbeit von der Einheit nMol/ mgProtein·min umgerechnet in µMol/g F.G.·h (Tabelle 3). Nach ULICH (unveröffentlicht) entspricht einem g Frischgewicht in der Mitteldarmdrüse 60, in der Antennendrüse 36, im Schwanzmuskel 47, im Herz 50 und im Cerebralganglion 15 mg Protein des bei 20000 g zentrifugierten Tris-Homogenat-Überstandes.

Die Aktivitäten der UDPG-Pyrophosphorylase, der Glykogen-Synthetase und der Glykogen-Phosphorylase in der Mitteldarmdrüse konnten experimentell nicht bestimmt werden und mußten daher folgendermaßen geschätzt werden: Es wurden die Mittelwerte der relativen Aktivitäten der Enzyme Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase und Aldolase bzw. die der Enzyme "condensing enzyme", Isocitratdehydrogenase und Malatdehydrogenase gebildet. Auf Grund dieser durchschnittlichen relativen Aktivitäten in der Mitteldarmdrüse wurden die absoluten Aktivitäten für die entsprechenden Enzyme berechnet und wieder in die Einheit µMol/g F.G.·h umgerechnet. Obwohl die erhaltenen Werte natürlich sehr fragwürdig sind, besonders die der UDPG-Pyrophosphorylase, wurde doch ein Vergleich mit den Aktivitäten der Enzyme der Ratte versucht.

Zur besseren Übersicht wurden wieder die relativen Aktivitäten für Krebs und Ratte gebildet (Tabelle 4). Man sieht, daß bei der Ratte die Enzyme Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase und Hexosephosphat-Isomerase ebenfalls alle ihre höchste Aktivität im Muskel haben, daß aber sonst kaum Übereinstimmung in den Mustern vorhanden ist. Wie beim Krebs, fällt auch bei der Ratte die UDPG-Pyrophosphorylase völlig aus dem Muster der vier anderen Enzyme heraus. Bei der Ratte hat die UDPG-Pyrophosphorylase allerdings ihre größte Aktivität in der

	UDPG-Pyrophosphorylase		Glykogen-Synthetase		Glykogen-Phosphorylase		Phosphoglucomutase		Hexosephosphat-Isomerase	
	C.	R.	C.	R.	C.	R.	C.	R.	C.	R.
MD Leber	(9)	100	(7)	85	(7)	16	11	34	8	52
AD Niere	21	6	15	14	12	2	15	8	28	65
SM Muskel	6	18	100	100	100	100	100	100	100	100
Herz	100	6	44	75	54	8	49	9	34	58
CG Gehirn	2	2	5	15	20	2	14	3	15	42

Tab. 4 Relative Aktivitäten einiger Enzyme bei Ratte und Orconectes. Die Werte beruhen auf den in Tab. 3 angegebenen absoluten Aktivitätsangaben.
Abkürzungen: MD - Mitteldarmdrüse, AD - Antennendrüse, SM - Schwanzmuskel, CG - Cerebralganglion, C. - Orconectes, R. - Ratte

Die Aktivitäten in den Organen wurden auf die gleich 100 gesetzte Aktivität des Organs mit der höchsten Aktivität bezogen.

Leber, beim Krebs wahrscheinlich im Herzen. Bemerkenswerterweise ist beim Krebs auch das Herz das Organ mit der größten Glykogenkonzentration, bei der Ratte die Leber (Tabelle 3).

Bildet man für jedes Enzym die durchschnittliche Aktivität aus den Aktivitäten in den fünf untersuchten Organen, so ist sie bei der Ratte ca. 2 bis 4 mal höher als bei Orconectes, wie Tabelle 3 zeigt. Eine Ausnahme bildet allerdings die Hexosephosphat-Isomerase, bei der die durchschnittliche Aktivität beim Krebs ca. 3 mal höher ist als bei der Ratte. Bedenkt man jedoch, daß bei Untersuchungen des gleichen Enzyms durch verschiedene Laboratorien sehr unterschiedliche Werte ermittelt werden, so scheinen keine wesentlichen Unterschiede in den durchschnittlichen Aktivitäten der hier untersuchten Enzyme bei Ratte und Krebs zu bestehen. Das ist auch bei anderen, von KELLER (1964) untersuchten Enzymen der Fall. Es gibt allerdings auch Befunde, die sich nicht so gut in diese Feststellung einreihen lassen. Wenn man z.B. die Aktivitäten der Glykogen-Phosphorylase in Rattenorganen, untersucht von FELLENBERG et al.(1962), mit denen des Krebses vergleicht, so ist die durchschnittliche Aktivität der Ratten-Phosphorylase ca. 30 bis 40 mal höher.

Diskussion

Die Proportionskonstanz der Enzyme Aldolase, Hexosephosphat-Isomerase, Phosphoglucomutase, Glykogen-Phosphorylase und Glykogen-Synthetase des Flußkrebses ist im Hinblick auf die Befunde von PETTE (1965) interessant. Zwar handelt es sich hierbei um Enzyme, die in einer Reaktionsfolge wirken, jedoch befinden sich in dieser Kette Verzweigungsstellen; eine besonders wichtige am G-6-P, die nach PETTE (1965) zumindest in den Organen unterschiedlicher Funktion spezifische Proportionen der Enzyme hätten erwarten lassen.

So stellt PETTE die zur PTG-Gruppe gehörenden Enzyme (Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Glycerophosphat-Mutase und Enolase) anderen Enzymen

der Glykolyse gegenüber (Phosphoglucomutase, Hexose-phosphat-Isomerase, Fruktose-6-Phosphat-Kinase, Aldolase und Pyruvatkinase). Im ersten Fall handelt es sich um Enzyme einer Reaktionskette ohne wesentliche Verzweigungsstellen; sie sind in den funktionell verschiedenen Geweben proportionskonstant. Im zweiten Fall gehören die Enzyme zu einer Reaktionskette, in der wichtige Verzweigungen vorkommen; hier konnte Proportionskonstanz nur in Geweben vergleichbarer Funktion, z.B. im Flugmuskel von Locusta und im Herzmuskel der Ratte, nachgewiesen werden. Dort stehen die Aktivitäten der Enzyme Hexosephosphat-Isomerase, der Phosphoglucomutase und der Aldolase in einem Verhältnis von ca. 100 : 50 : 30, beim Krebs in Schwanz- und Herzmuskel in einem Verhältnis von 10(: 30 : 13.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von PETTE (1965) kann man vermuten, daß die Proportionskonstanz in allen Geweben des Krebses nicht nur für die hier genannten Enzyme gilt, sondern auf die gesamte Stoffwechselkette Glykogen-Synthetase - Pyruvatkinase auszudehnen ist.

Aus diesem Muster fallen aber andere, für den Kohlenhydratstoffwechsel ebenfalls wichtige Enzyme auffällig heraus, wie für die UDPG-Pyrophosphorylase bereits gezeigt wurde und wie es auch für die Enzyme Hexokinase und Lactatdehydrogenase (KELLER 1964) gilt. Jedes dieser Enzyme weist ein anderes Organverteilungsmuster auf.

Vergleicht man nun mit den Verhältnissen bei der Ratte, so sind auch hier die Enzyme der Stoffwechselkette Glykogen-Synthetase - Pyruvatkinase zumindest in den Organen Leber, Niere , Muskel, Herz und Gehirn annähernd proportionskonstant, wie aus den Untersuchungen von FELLENBERG et al. (1962) zu ersehen ist. Aus Tabelle 5 geht hervor, daß auch die quantitative Enzymausstattung der Organe bei Krebs und Ratte vergleichbar ist, denn die Durchschnitte der relativen Aktivitäten in den hier untersuchten Organen entsprechen sich etwa. Es war ja bereits festgestellt worden, daß sich Krebs- und Rattenenzym auch kaum in ihren Absolutaktivitäten unterscheiden.

Auch bei der Ratte fallen wie beim Krebs die Enzyme

	MD Leber	AD Niere	SM Muskel	Herz	CG Gehirn
Orconectes	7	17	100	45	14
Ratte	22	26	100	36	21

Tab. 5 Durchschnitte der relativen Aktivitäten von Enzymen aus proportionskonstanten Gruppen. Bei der Ratte besteht die Gruppe aus den Enzymen Glykogen-Phosphorylase[1], Hexosephosphat-Isomerase[1], Aldolase[1], Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase[1], Phosphoglycero-Kinase[1], Phosphoglycero-Mutase[1], Enolase[1], Pyruvatkinase[1]. Beim Krebs besteht die Gruppe aus den Enzymen Glykogen-Synthetase[4], Glykogen-Phosphorylase[4], Hexosephosphat-Isomerase[4], Phosphoglucomutase[4], Aldolase[2].

		MD Leber	AD Niere	SM Muskel	Herz	CG Gehirn
Ratte	LDH[1]	100	11	58	33	9
	Hex[1]	46	62	34	100	18
	Pyr[3]	100	6	18	6	2
Orconectes	LDH[2]	9	29	49	100	19
	Hex[2]	3	100	1	65	17
	Pyr[4]	(9)	21	6	100	2

Tab. 6 Relative Aktivitäten von Enzymen mit spezifischen Proportionen bei Ratte und Orconectes.

Literatur: 1) FELLENBERG et al. (1962)
2) KELLER (1964)
3) VILLAR-PALASI und LARNER (1960)
4) Diese Arbeit

Abkürzungen: MD-Mitteldarmdrüse
AD-Antennendrüse
SM- Schwanzmuskel
CG-Cerebralganglion
LDH-Lactatdehydrogenase
Hex- Hexokinase
Pyr-Pyrophosphorylase

In Tab. 5 und 6 wurden die Aktivitäten in den Organen auf die gleich 100 gesetzte Aktivität des Organs mit der höchsten Aktivität bezogen.

Hexokinase, Lactatdehydrogenase (FELLENBERG et al. 1962) und UDPG-Pyrophosphorylase (VILLAR-PALASI und LARNER 1960) aus diesem Muster heraus, zeigen aber interessanterweise je eine ganz andere Organverteilung als beim Krebs (Tabelle 6).

Als Folge der unterschiedlichen Kombination von Enzymaktivitäten eines Stoffwechselweges in den Organen bei Krebs und Ratte bestehen sicherlich Unterschiede in der Einstellung der Fließgleichgewichte und damit Unterschiede in der Stoffwechselintensität. Diese Tatsache mag ein Grund dafür sein, daß trotz etwa gleicher quantitativer Enzymausstattung die Stoffwechselintensität bei Krebs und Ratte stark differiert; eine Frage, die KELLER (1964) aufgeworfen hat.

Für die Glykogen-Synthetase ist eine Aktivitätsbestimmung in mehreren Organen des Krebses Cancer magister durchgeführt worden (WANG und SCHEER 1963). Auffällige Unterschiede der Aktivitäten von Cancer magister und Orconectes limosus zeigen sich nur in der Hypodermis (Tabelle 7).

	BM	SM	Hy	Herz	MD	CG
Cancer	59		51	53	3	0
Orconectes		53	1	22		8

Tab. 7 Organverteilungsmuster der Glykogen-Synthetase (nMol/mg Protein·min) bei Cancer magister (WANG und SCHEER 1963) und Orconectes limosus (diese Arbeit). Abkürzungen: BM = Beinmuskel, SM = Schwanzmuskel, Hy = Hypodermis, MD = Mitteldarmdrüse, CG = Cerebralganglion

b Monatliche Messungen der Konzentrationen einiger Metabolite im Schwanzmuskel und der Aktivitäten einiger Enzyme im Schwanzmuskel und anderen Organen.

I. Aktivitätsbestimmungen der Enzyme Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase und Phosphoglucomutase.

In jedem Monat wurden im Schwanzmuskel die Aktivitäten der Enzyme Synthetase I und Gesamtsynthetase (Tabelle 8), Phosphorylase a und Gesamtphosphorylase (Tabelle 10)und Phosphoglucomutase (Tabelle 9) bestimmt. Den Aktivitätswerten der Phosphorylase und Phosphoglucomutase in den Organen Herz, Enddarm, Antennendrüse und Cerebralganglion liegen nicht genug Einzelbestimmungen zugrunde,so daß eine exakte statistische Aussage hier nicht möglich war.

Es fällt auf, daß die Gesamtphosphorylase (Phosphorylase a+b), die Gesamtsynthetase (Synthetase I+D) und die Phosphoglucomutase im Winter (Oktober bis März) in den untersuchten Organen eine höhere Aktivität haben als im Sommer (April bis September). Dieser Unterschied ließ sich im Schwanzmuskel für alle drei Enzyme statistisch sichern ($p \leq 0{,}01$). Interessant ist der starke Abfall der Synthetase I+D -Aktivität im Muskel von Monat März bis April ($0{,}05 > p > 0{,}01$). Diese Tatsache wird später im Zusammenhang mit der hier gleichfalls stattfindenden Verminderung der Glykogenkonzentration diskutiert.

In den Organen Antennendrüse und Darm fällt die geringe Aktivität der Gesamtphosphorylase in den Sommermonaten auf (Tabelle 10). Diese Verminderung der Enzymaktivität scheint in Zusammenhang mit der Häutung zu stehen: Krebse unmittelbar vor der Häutung (Carapax weich) und unmittelbar na ch der Häutung (neuer Carapax noch weich) zeigen keine Phosphorylase-Aktivität, während bei den gleichen Tieren eine Aktivität der Phosphoglucomutase in Antennendrüse und Darm nachzuweisen ist.

Wichtiger als die Veränderungen der Gesamtaktivität erscheinen die Konzentrationsschwankungen der "aktiven" Phosphorylase und der "aktiven" Synthetase im Laufe des Jahres. Schon die orientierenden Messungen lassen deutlich

	Glykogen-Synthetase		
	Schwanzmuskel		
	I	I %	I+D
Jan.	3,6 3,7	9,8 9,9	36,5 8,2
Feb.	2,0 3,2	4,1 5,7	39,5 13,8
März	1,2 2,1	3,9 6,8	34,8 9,4
April	4,3 3,2	31,5 36,5	18,6 11,8
Mai	10,4 4,5	52,1 31,5	28,2 8,4
Juni	7,9 2,8	28,7 7,8	27,3 8,4
Juli	4,3 3,9	17,3 14,1	26,0 6,9
Aug.	11,4 6,4	28,4 11,7	39,9 18,6
Sep.	7,4 4,2	22,6 13,6	34,3 6,2
Okt.	7,6 6,4	18,7 14,9	39,4 8,1
Nov.	3,6 4,2	11,7 12,7	31,7 2,0
Dez.	1,0 2,3	2,1 4,6	46,8 12,2

Tab. 8 Aktivitäten der Glykogen-Synthetase (nMol/mg Protein·min). Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Monat betrug zwischen N=5 und N=13

	Phosphoglucomutase				
	SM	Herz	ED	AD	CG
Jan.					
Feb.	1891 257	428 24	418 103	695 51	560 18
März	871				
Apr.	1011 543				
Mai	900 104				
Juni	1211 502	191 74	202 64	229 79	309
Juli	1267 62	231 11	173 40	292 25	
Aug.	1055 323		155	229	
Sep.	935 51	185 39	202 40	287 37	399
Okt.	1630 364	477 160	327 64	260 43	361
Nov.					
Dez.					

Tab. 9 Aktivitäten der Phosphoglucomutase (nMol/mg Protein·min). Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Monat betrug zwischen N=1 und N=5. Oberer Wert: $\bar{x}$, unterer Wert: s

	Schwanzmuskel			Herz			Darm			Antennendrüse			Cerebralganglion		
	a	a%	a+b	a	a%	a+b	a	a%	a+b	a	a%	a+b	a	a%	a+b
Januar	22,8 23,8	15,7 12,5	120,6 26,6	18,4	24,3	77,1	0	0	24,6	14,4	45,4	31,7	55,5	99	56,1
Februar	38,1 30,1	25 17,6	148,1 26,1	0	0	56,5 2,9	3,4	4,7	46,6 27,2	14,9 7,3	35,1 11,4	37,4 5,3	73,0 8,2	80,1 8,7	91,1 0,1
März	23,6 15,5	17,0 7,5	129,5 46,7	0	0	42,1	0	0	23,6						
April	32,2 26,0	34,3 29,5	105,4 25,2	0	0	38,5 5,8	0	0	20,7 3,6	2,1	20,4	9,6 0,5			
Mai	54,2 51,5	44,4 44,1	109,2 21,3	0	0	61,5 12	3,0 6,0	8,5 16,9	36,8 3,7	8,3 7,0	44,2 33,6	16,5 4,3	26,7 4,4	65,4 7,7	40,9 4,4
Juni	40,7 35,3	44,9 45,0	110,8 25,8												
Juli	33,8 39,8	32,2 39,6	101,7 25,7	0	0	48	1,7 1,7	7,6 7,6	10,5 10,5	4,0 4,0	46,3 46,3	8,8 8,8			
August	13,0 27,0	11,4 22,2	93,6 19,4	0	0	26,1 6,4	0	0	4,8 5,6	2,9 3,3	66,5	4,4 5,0	35,9	96,3	37,3
September	4,1 3,9	4,1 7,3	90,0 17,7	0	0	21,8 4,1	0	0	13,9 5,6	5,1 0,8	59,4 11,4	9,2 3,1	0	0	42,3
Oktober	8,9 12,5	5,6 8,8	109,9 20,6	0	0	31 8	0	0	53 9,3	7,3 4,0	55,4 23,6	12,4 1,8	38,3	75,9	50,5
November	6,5 5,5	5,8 4,7	107,1 17,3	1,9	8,8	21,2	5,8	30,0	19,2	8,5	65,5	12,9			
Dezember	20,2 22,0	13,5 11,7	131,1 41	9,2 3,3	30,2 15,6	50,3 23,5	6,5 4,2	15,5 11,9	46,3 15,8	23,8 13,2	72,8 18,6	31 10	54,3 9,9	73,1 10,5	74,3 8,0

Tab. 10 Aktivitäten der Glykogen-Phosphorylase (nMol/mg Protein·min).
Bei den monatlichen Bestimmungen im Schwanzmuskel ist N zwischen 7 und 17. In den anderen Organen wurde die Aktivität an 1 bis 5 Tieren pro Monat bestimmt.
Die oberen Werte geben $\bar{x}$ an, die unteren s.

werden, daß jedes Organ seinen eigenen spezifischen Prozentsatz an Phosphorylase a besitzt (Tabelle 10), der sich in einigen Organen im Laufe des Jahres ändert und in anderen Organen relativ konstant bleibt. Im Schwanzmuskel und Herz liegen periodische Veränderungen vor, im Cerebralganglion ist die Phosphorylase während des ganzen Jahres durchschnittlich zu 81,6 %, in der Antennendrüse zu 51,1 % aktiv und im Darm wohl vorwiegend inaktiv. Synthetase wurde auf jahreszeitliche Veränderungen nur im Schwanzmuskel untersucht. Der Prozentsatz an "aktiver" Form ändert sich periodisch und zwar ist er in den Monaten April bis September höher als in den Monaten Oktober bis März, während die Phosphorylase a im Schwanzmuskel in den Monaten Januar bis Juni höher ist als in den Monaten Juli bis Dezember. Signifikante Unterschiede benachbarter Monate konnten für die aktiven Formen beider Enzyme nicht gesichert werden. Maximaler und minimaler Wert des Jahres sind für Phosphorylase a und Synthetase I signifikant unterschiedlich ($p<0,01$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die Gesamtaktivität der untersuchten Enzyme ändert sich im Laufe des Jahres. Bei der Phosphoglucomutase ist diese prozentuale Änderung der Aktivitäten in den untersuchten Organen annähernd gleich; bei der Phosphorylase nicht. Bei Enzymen, die eine "aktive" und "inaktive" Form haben, ist das Verhältnis der Formen zueinander für jedes Organ spezifisch. Die Konzentration der "aktiven" Form ändert sich in einigen Organen im Laufe des Jahres; in anderen nicht.

II. Konzentrationsbestimmungen einiger Metabolite im Schwanzmuskel.

a) Kohlenhydrate

An Kohlenhydraten wurden das durch Äthanol fällbare Polysaccharid, die durch Äthanol nicht fällbaren, im Überstand verbleibenden "löslichen" Kohlenhydrate, die nach SPECK(1967) zu einem Teil aus Trehalose bestehen, und freie Glucose in jedem Monat bestimmt (Tabelle 11).

	"lösliches"K.H.			Glucose			Polysaccharid		
	(N)	Konz.	p	(N)	Konz.	p	(N)	Konz.	p
Januar	(6)	487,0 69,9		(7)	29,2 13,3		(7)	39,9 28,3	
			0,003			0,005			0,001
Februar	(6)	273,8 94,5		(5)	11,9 3,4		(6)	9,4 3,9	
März	(9)	355,2 246,4		(5)	21,0 9,2		(9)	28,1 30,5	
			0,0004			0,0002			0,003
April	(6)	12,3 7,7		(5)	1,8 1,5		(6)	1,9 1,4	
Mai	(15)	14,7 15,7		(5)	1,5 1,1		(15)	4,6 6,6	
			0,0004						0,009
Juni	(8)	55,0 28,0		(5)	3,1 1,2		(8)	10,9 9,7	
						0,012			
Juli	(12)	38,7 28,7		(6)	7,3 2,9		(12)	14,8 11,8	
August	(7)	35,0 8,6		(6)	5,8 3,9		(7)	12,9 9,7	
			0,0002						0,022
September	(9)	117,6 73,6		(6)	6,7 1,8		(9)	3,4 2,3	
						0,02			0,018
Oktober	(13)	208,7 127,6		(6)	18,6 9,7		(13)	10,8 8,9	
			0,014						0,018
November	(6)	355,0 63,7		(8)	16,5 6,3		(8)	48,4 52,4	
			0,0025			0,004			
Dezember	(10)	631,0 224,0		(5)	41,0 11,4		(11)	54,1 61,9	

Abb. 11 Kohlenhydratkonzentration (µg Glucoseäquivalente/ mg Protein) im Schwanzmuskel, aufgeschlüsselt in "lösliches" Kohlenhydrat, d.i. nicht durch Äthanol fällbares Kohlenhydrat, Glucose und Polysaccharid, d.i. durch Äthanol fällbares Kohlenhydrat.
Dazu sind die p-Werte (nur $p \leq 0{,}05$) angegeben, die sich bei Vergleich der Werte zweier benachbarter Monate mit Hilfe des t-Tests ergeben. Die obere Zahl bedeutet $\bar{x}$, die untere s.

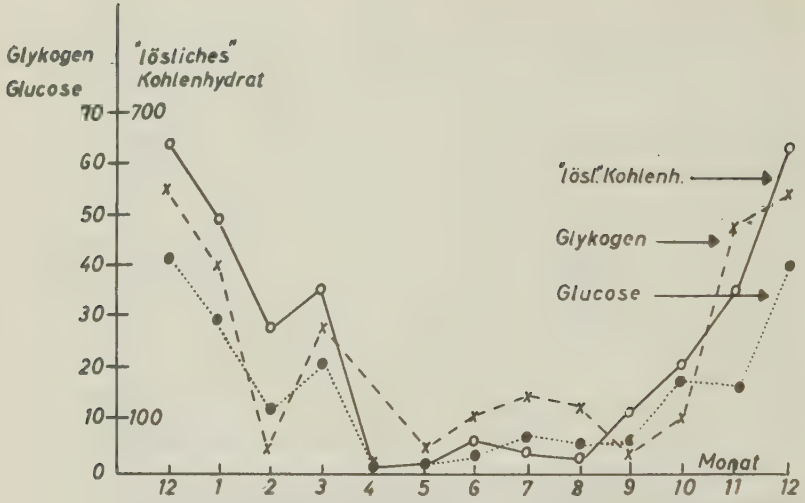


Abb.2 Monatsdurchschnitte der Glykogen-, der "löslichen" Kohlenhydrat- und der Glucosekonzentration im Schwanzmuskel (µg Glucoseäquivalente/mg Protein).

Allgemein ist zu sagen, daß die Kohlenhydratkonzentration des Muskels im Winter um eine bis zwei Zehnerpotenzen höher ist als im Sommer (Abbildung 2). Ein signifikanter Abfall erfolgt von Januar auf Februar, der nächste von März auf April; die p-Werte sind in Tabelle 11 angegeben. Im Monat April ist die Kohlenhydratkonzentration im Schwanzmuskel am niedrigsten (April: 14,2 µg K.H./mg Protein - Dezember: 685 µg K.H./mg Protein). Im Sommer steigt die Kohlenhydratkonzentration wieder langsam an, fällt jedoch beim Polysaccharid im September wieder signifikant. Die "löslichen" Kohlenhydrate werden von August auf September signifikant vermehrt; Glucose und Glykogen von September auf Oktober.

b) Nukleotide, G-6-P und Orhthophosphat

Die Konzentrationsbestimmungen in den einzelnen Monaten von G-6-P, anorganischem Phosphat und den Nukleotiden ATP, ADP und AMP sind in Tabelle 12 angegeben. Die An-

gaben erfolgten in mMol/l intrazelluläres Wasser. Dieses ergab sich als Differenz aus Gesamtwassergehalt des Muskels (84,5 ± 2,2 ml/100g F.G.) und extrazellulärem Wassergehalt (26,9 ± 5,2 ml/100g F.G.) zu durchschnittlich 57,6 ml/100g F.G.. Die Streuung der Werte des extrazellulären Wassers sind groß. Ein Grund dafür dürfte ausschließlich in der nicht sehr guten Bestimmungsmethode zu suchen sein. Für den Sartoriusmuskel des Frosches fanden NARAHARA et al. (1960) 58 ml intrazelluläres Wasser/100g F.G. und für den Muskel von Astacus fluviatilis fanden ZACHAR und HENCEK (1965) 270 ml intrazelluläres Wasser/100g Trockengewicht, das dürften ca. 50 ml/100g F.G. sein.

Bei diesen Untersuchungen wurde besonders darauf geachtet, daß die Tiere beim Herausnehmen aus den Becken nicht aufschreckten und sofort in Heptan von -70°C getötet wurden. Tabelle 13 zeigt, wie sich die Konzentrationen der hier untersuchten Metabolite im Schwanzmuskel nach Schwimmen ändert. Bei ca. 10-minütigem Schwimmen vermehrt sich G-6-P etwa um das 10 fache, AMP und Pi um das 2 bis 3 fache. ATP vermindert sich nicht signifikant ($p > 0,05$), die Summe der Nukleotide verändert sich nicht ($p > 0,05$), das Verhältnis von ATP/ADP wird kleiner.

	G-6-P	ATP	ADP	AMP	Pi	$\sum \frac{ATP}{ADP}$ AMP	$\frac{ATP}{ADP}$	$\sum \frac{ATP}{ADP}$ G-6-P / AMP
Ruhe (N=5)	0,10	7,09	0,88	0,25	19,2	8,22	8,04	32,4
	0,11	1,10	0,22	0,05	1,7	1,29		
Bewegung (N=5)	1,30	5,67	1,53	0,61	45,4	7,76	3,67	13,8
	0,75	1,82	0,44	0,35	9,6	1,25		

Tab. 13 Konzentration (mMol/l) von G-6-P, ATP, ADP, AMP und Pi im Schwanzmuskel von ruhenden und von ca. 10 Minuten zum Schwimmen gezwungener Krebse.
Die obere Zahl bedeutet $\bar{x}$, die untere s. Die Versuche fanden im Februar/März statt.

Von den monatlichen Untersuchungen der Nukleotide und des G-6-P im Schwanzmuskel sollen folgende Tatsachen heraus-

	Pi	G-6-P	ATP	ADP	AMP	$\frac{ATP}{ADP}$	$\sum \frac{ATP\ ADP\ G\text{-}6\text{-}P}{AMP}$	$\sum ATP\ ADP\ AMP$
Februar		0,17 0,10	6,36 1,57	0,77 0,24	0,21 0,07	8,28	36,5	7,34
März	19,2 1,7	0,05 0,01	5,90 0,10	0,74 0,07	0,22 0,01	8,0	31,0	6,85
April		0,02 0,01	6,09 o,12	1,09	0,45	5,6	15,9	7,63
Mai		0,03 0,01	7,98 0,14	1,29 0,03	0,42 0,05	6,17	22,4	9,69
Juli		0,97 0,41	14,12 1,31	1,12 0,21	0,12 0,01	12,6	135,1	15,36
August		0,48 0,34	10,90 3,25	1,07 0,23	0,16 0,08	10,2	76,8	12,13
September		0,10 0,03	10,30 0,07	1,58 0,20	0,73 0,05	6,52	16,5	12,61
Oktober		0,52 0,12	7,84 0,46	1,02 0,17	0,28 o,07	7,68	34,0	9,14
November		0,27 0,07	8,20 0,20	1,05 0,05	0,27 0,02	7,85	35,6	9,51

Tab. 12 Konzentrationen von ATP, ADP, AMP, G-6-P und Pi im Schwanzmuskel von Orconectes (mMol/l intrazelluläres Wasser).
In einigen Fällen betrug die Anzahl der Bestimmungen pro Monat N=1, in den übrigen Fällen zwischen N=3 und N=5. Die obere Zahl gibt x an, die untere s.

gestellt werden: Während des ganzen Jahres finden Konzentrationsveränderungen statt. Für G-6-P ist der niedrigste Monatsdurchschnittswert 0,02; der höchste 0,97; für ATP der niedrigste 5,90; der höchste 14,12; für ADP der niedrigste 0,74; der höchste 1,58; für AMP der niedrigste 0,12; der höchste 0,73 mMol/l. Außerdem steigt die Summe der Nukleotide von 6,85 im März auf 15,36 mMol/l im Juli.

Diese hier genannten Befunde sollen zeigen, daß die Konzentrationsveränderungen sich in Größenordnungen abspielen, die mit den Befunden bei Wirbeltiermuskeln übereinstimmen (HELMREICH und CORI 1965, WILLIAMSON 1965, MORGAN und PARMEGGIANI 1964) und die für die Regelung der Phosphorylase b- und Synthetase D-Aktivität durch diese allosterischen Effektoren äußerst relevant sind, wenn man bedenkt, daß die Ka G-6-P für Synthetase D in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-3} M, die von AMP für Phosphorylase b von 10^{-5} bis 10^{-4} M, und die Ki ATP für Phosphorylase b von 10^{-3} bis 10^{-2} M und die Ki G-6-P für Phosphorylase b von 10^{-4} bis 10^{-3} M in der Literatur für Wirbeltierenzym angegeben ist und größenordnungsmäßig auch für die Enzyme der Krebse zutreffen, wie auf den folgenden Seiten gezeigt wird.

Diskussion

Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Veränderungen der Enzymaktivitäten und Metabolitkonzentrationen im Muskel unter dem Aspekt der Häutung oder unter dem Aspekt der Poikilothermie der Krebse zu beurteilen sind. Betrachtet man z.B. die Veränderung der Glykogenkonzentration anderer, sich aber nicht häutender poikilothermer Tiere, z.B. die des Frosches (MIZELL 1965), so stellt man fest, daß auch hier im Frühjahr das Glykogen stark abnimmt, im Sommer niedrig bleibt und zum Herbst wieder ansteigt, obwohl die Frösche wie auch die Krebse im Frühjahr anfangen, Nahrung in verstärktem Maße aufzunehmen. In beiden Fällen ist die Glykogen- wie auch die gesamte Kohlenhydratabnahme beim Krebs als ein Zeichen

vermehrter Stoffwechselintensität aufzufassen, die ihren Grund in der Temperaturerhöhung im Frühjahr haben dürfte. DEAN und VERNBERG (1965) stelltenbei Uca bei der Akklimatisation an verschiedene Temperaturen keine qualitative Änderung des Kohlenhydratstoffwechsels, wohl aber eine quantitative Änderung fest. Sie kamen zu dem Schluß, daß der Krebs bei niedrigen Temperaturen seinen " energy output" auf ein minimales Maß herabsetzt. Auch der Sauerstoffverbrauch nimmt bei Erhöhung der Temperatur zu. VERNBERG (1959) hat bei Uca pugilator und Uca minax eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches bei der Überschreitung von etwa 10°C Wassertemperatur festgestellt, und gerade im April, zur Zeit der stärksten Glykogenabnahme wird die 10° C Grenze erreicht, bzw. im Oktober, zur Zeit der Glykogenzunahme, unterschritten, wie Abbildung 8 deutlich zeigt.

Die zyklischen Veränderungen der Kohlenhydrat-, Nukleotid- und G-6-P -Konzentration im Muskel konnten nicht mit einzelnen Häutungsstadien in Zusammenhang gebracht werden. Ebenso verhält es sich mit den Aktivitäten der Enzyme im Muskel.

Aus diesem Grund erschien es angebracht die Ergebnisse der Bestimmungen im Muskel in Abhängigkeit von der Jahreszeit und nicht in Abhängigkeit von den Häutungsstadien zu sehen.

c Nähere Charakterisierung der Enzyme Glykogen-Phosphorylase und Glykogen-Synthetase: In vitro und in vivo Umwandlung der Phosphorylase b in die Phosphorylase a, Aktivierung und Hemmung der Phosphorylase b und der Synthetase D durch allosterische Effektoren.

Im Folgenden soll versucht werden die Enzyme Glykogen-Phosphorylase und Glykogen-Synthetase durch einige kinetische Daten genauer zu charakterisieren. Und zwar wurde die Synthetase D auf ihre Aktivierbarkeit durch G-6-P und die Phosphorylase b auf ihre Aktivierbarkeit durch AMP und Hemmbarkeit durch ATP geprüft. Es muß darauf

aufmerksam gemacht werden, daß für diese Untersuchungen keine gereinigten Enzyme verwandt wurden und die gefundenen Konstanten möglicherweise verfälscht sind. Nur solche Homogenate wurden verwandt, in denen allein die "inaktive" Form nachgewiesen werden konnte. Immerhin mögen die Befunde doch Aufschluß darüber geben, in welchen Größenordnungen sich Aktivierung und Hemmung abspielen. Gleichzeitig gestatten sie eine Aussage darüber, ob die im Muskel vorgefundenen Konzentrationen von Nukleotiden und G-6-P für die Regelung der "inaktiven" Form der Enzyme in vivo in Frage kommen könnten.

Außerdem soll die Umwandlung der Phosphorylase b nach a in vitro und in vivo untersucht weiden.

Umwandlung der Phosphorylase b in Phosphorylase a in vitro und in vivo:
Die Versuche von COWGILL (1956, 1959) und KELLER (1965) zeigten bereits das Vorkommen zweier ineinander überführbarer Formen der Phosphorylase beim Krebs: Phosphorylase a und Phosphorylase b. Im Muskel geschieht die Umwandlung von b nach a bei den Wirbeltieren unter Phosphorylierung mit ATP an zwei Serinresten der Phosphorylase b unter gleichzeitiger Dimerisierung, katalysiert durch das Enzym Phosphorylase-b-Kinase (KREBS und FISCHER 1962; KREBS et al. 1964):
2 Phosphorylase b + 4 ATP = 1 Phosphorylase a + 4 ADP
Die Umwandlung von a nach b wird katalysiert durch das Enzym Phosphorylase-Phosphatase:
1 Phosphorylase a + 4 H_2O = 2 Phosphorylase b + 4 Pi
Für den Hummermuskel konnte COWGILL (1959) das Vorkommen beider Enzyme nachweisen.

Aus Versuchen von DANFORTH, HELMREICH und CORI (1962) am Sartoriusmuskel des Frosches geht hervor, daß für das Verhältnis von "aktiver" und "inaktiver" Phosphorylase vornehmlich die Aktivität der Phosphorylase-b-kinase verantwortlich zu machen ist. Im ruhenden Wirbeltiermuskel liegt die Phosphorylase zum größten Teil in der "inaktiven" Form b vor, das heißt die Phosphorylase-b-Kinase ist ebenfalls inaktiv (DANFORTH et al. 1962). Zwei Mechanismen

sind bekannt, durch die die Phosphorylase-b-Kinase und damit die Phosphorylase aktiviert werden kann: 1. Reizung des Muskels durch Adrenalin, 2. Reizung des Muskels durch elektrische Impulse (DANFORTH et al.1962; KREBS etal.1964). Die Stimulierung des Muskels durch Adrenalin beruht auf den Vorgängen, die in Abbildung 3 schematisch angegeben sind. Durch eine Cyclase wird aus ATP das zyklische 3'5'-AMP gebildet, das gemeinsam mit ATP und Mg^{2+} die inaktive Phosphorylase-b-Kinase unter Phosphorylieren in die aktive Kinase überführt (KREBS et al. 1966). Die Aktivierung der Kinase durch elektrische Reizung des Muskels beruht auf der Tatsache, daß während der Muskelarbeit Ca^{2+} aus dem sarcoplasmatischen Reticulum (Longitudinal System) in des Sarcoplasma freigesetzt wird und dort die Phosphorylase-bKinase unter Mitwirken eines Kinase-aktivierenden Faktors (KAF) aktiviert (MEYER et al. 1964). Bei der elektrischen Reizung des Muskels wird 3'5'-AMP nicht vermehrt gebildet, wie bei Reizung durch Adrenalin (POSNER et al. 1965).

Die Aktivierung der Phosphorylase-b-Kinase ist in beiden Fällen auf die Verschiebung des pH-Optimum zum Sauren zurückzuführen. Das Enzym hat jetzt sein pH-Optimum bei pH 7 und nicht mehr bei pH 9 wie die inaktive Kinase. Anders ausgedrückt, bedeutet die Aktivierung der Kinase ein Herabsetzen der Michaeliskonstante der Phosphorylase-b-Kinase für Phosphorylase b bei pH 7. Es ist anzunehmen, daß beide Aktivierungsmechanismen gleiche

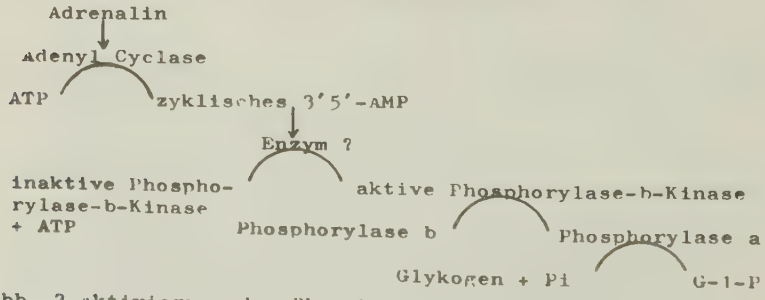


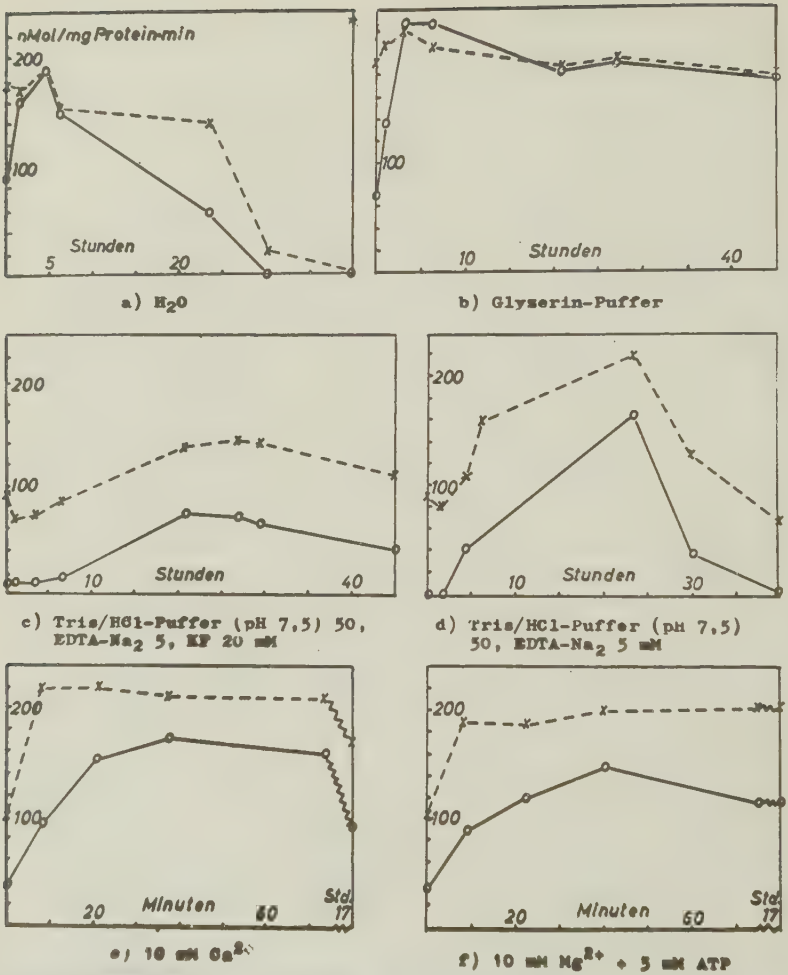
Abb. 3 Aktivierung der Phosphorylase durch Adrenalin (KREBS 1966).

Konformationsänderungen an der Phosphorylase-b-Kinase hervorrufen(MEYER et al. 1964).

Die eben zitierten Aktivierungsmechanismen sind an Wirbeltieren untersucht worden. Nach den Befunden von KELLER (1965) sieht es aber so aus, als ob auch bei Krebsen die Umwandlung von b nach a durch hormonale Beeinflussung erfolgen kann. Das für diesen Vorgang charakteristische Auftreten von 3'5'-AMP ist zwar für den Krebs noch nicht nachgewiesen worden, jedoch für einen anderen Vertreter der Wirbellosen, den Leberegel Fasciola hepatica(MANSOUR et al. 1960). Die Aktivierung der Phosphorylase-b-Kinase der Krebse durch Ca^{2+} erscheint plausibel angesichts der strukturellen Ähnlichkeit von Krebs- und Wirbeltiermuskel und der Tatsache, daß auch hier Ca^{2+} bei Muskelkontraktionen aus dem sarcoplasmatischen Reticulum in das Sarcoplasma freigesetzt wird und nach der Kontraktion mittels eines aktiven Transportmechanismus wieder in das Reticulum gelangt (HASSELBACH 1965).

Um die Möglichkeit einer Umwandlung der Phosphorylase b nach a in vitro zu prüfen, wurden Muskelhomogenate ohne oder mit Zusatz von Ca^{2+} bzw. ATP + Mg^{2+} inkubiert. Der Schwanzmuskel wurde in verschiedenen Extraktionsmedien homogenisiert; das Homogenat wie üblich bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand bei 25°C inkubiert. Die Extraktionsmedien waren: a) H_2O, b) Glyzerin-Puffer (60 % Glyzerin in Tris/HCl-Puffer 50, EDTA-Na_2 5, KF 100), c) Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, EDTA-Na_2 5, KF 20, d) Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, EDTA-Na_2 5, e) der nach c behandelte Muskel wurde nach dem Zentrifugieren unter Zusatz von $CaCl_2$ 10, oder f) unter Zusatz von $MgCl_2$ 10 + ATP 5, vorinkubiert. Die Konzentrationsangaben bedeuten mMol/l.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Sie zeigen, daß in vitro eine Umwandlung der b- in die a-Form, bei gleichzeitiger Vermehrung der Gesamtaktivität stattfindet, die stark beschleunigt wird durch Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} + ATP. Bei Verwendung von Wasser und Glyzerin-Puffer findet anscheinend schon bei der Extraktion eine Umwandlung der b- in die a-Form statt; ebenso ist die Ge-



a) H_2O

b) Glyzerin-Puffer

c) Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, EDTA-Na_2 5, KF 20 mM

d) Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, EDTA-Na_2 5 mM

e) 10 mM Ca^{2+}

f) 10 mM Mg^{2+} + 5 mM ATP

Abb. 4 Umwandlung der Phosphorylase b zu Phosphorylase a in vitro. Der Schwanzmuskel des Krebses wurde mit verschiedenen Extraktionsmedien homogenisiert und der 20000 g-Überstand des Homogenats bei 25°C inkubiert (a, b, c, d). Der 20000 g-Überstand des Homogenats (Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, EDTA-Na_2 5, KF 20 mM) wurde mit Ca^{2+} oder Mg^{2+} + ATP bei 25°C inkubiert (e,f).
×---× Phosphorylase a+b, o——o Phosphorylase a

Gesamtaktivität von Anfang an höher. Allerdings ist der letztere Befund nur für das Glyzerin-Puffer-Homogenat gut reproduzierbar. Die folgenden Befunde sollen zeigen, ob eine Umwandlung der Phosphorylase b nach a und eine Vermehrung der Gesamtaktivität auch in vivo stattfindet. Hierzu wurden die Krebse in ihren Becken 10 Minuten hin- und hergejagt, anschließend in Heptan von -70°C getötet und der Muskel sofort präpariert und homogenisiert. Die Bereitschaft zum Schwimmen war sehr unterschiedlich, was in der großen Streuung der Aktivitäten zum Ausdruck kommt (Tabelle 14).

	Pho a	a %	Pho a+b	
aktive Krebse, Dez. (N=7)	103,9 71,3	63,7 35,0	156,6 56,6	p (a%) aktive Dez./ ruhende Dez. $\leq 0,01$
ruhende Krebse, Dez. (N=8)	20,2 22,0	13,5 11,7	131,1 41,0	p (a+b) aktive Dez./ ruhende Dez. $> 0,05$

Tab. 14 Aktivität (nMol/mgProtein·min) der Gesamtphosphorylase und der Phosphorylase a im Schwanzmuskel von Orconectes nach Jagen der Krebse für 10 Minuten. Im Vergleich dazu die Werte der ruhenden Krebse im Dezember. In der rechten Spalte sind die p-Werte angegeben, die sich aus den t-Test Vergleichen ergeben. Die obere Zahl gibt $\bar{x}$ an, die untere s. Abkürzungen: Pho = Glykogen-Phosphorylase

Die Versuche wurden im Dezember durchgeführt. Ein t-Test Vergleich zwischen der Aktivität der Phosphorylase a der gejagten und der der ruhenden Krebse im Dezember ergab einen signifikanten Unterschied mit $p \leq 0,01$ (Tabelle 14). Leider war die Gesamtaktivität der ruhenden Tiere im Dezember ebenfalls hoch, jedoch nicht signifikant von November verschieden, so daß für diesen Monat der Unterschied von ruhenden und gejagten Krebsen in Bezug auf die Gesamtaktivität nicht gesichert werden konnte. Es werden aber die Gesamtaktivitäten erreicht, die als Maximalaktivitäten bei den Inkubationsversuchen erzielt werden ($p > 0,05$). Die Gesamtaktivität der Glykogen-Phosphorylase eines gejagten Krebses, bei dem Phosphorylase hauptsächlich in der

a-Form vorliegt, und deren Gesamtaktivität gegenüber der durchschnittlichen Aktivität von Ruhetieren höher zu sein scheint, läßt sich nicht wesentlich weiter durch Inkubation des Homogenats mit Ca^{2+} erhöhen. Ein Beispiel wird in Tabelle 15 gezeigt.

	Pho a	a %	Pho a+b
Aktivität ohne Vorinkubation mit Ca^{2+}	167,5	92	182,5
Aktivität nach 40 Minuten Vorinkubation mit 10 mM Ca^{2+}	193,5	103	187,5

Tab. 15 Aktivität (nMol/mgProtein·min) der Glykogen-Phosphorylase im Schwanzmuskel eines 10 Minuten gejagten Krebses vor und nach Inkubation des Homogenats mit Ca^{2+}.

In den Organen Herz, Antennendrüse, Darm und Cerebralganglion läßt sich nach Jagen der Krebse kein Unterschied in der Phosphorylase-Aktivität zu der von Ruhetieren feststellen.

Diskussion

Die beschleunigte Vermehrung der Phosphorylase a bei Inkubationen des Muskelhomogenats mit Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} + ATP spricht dafür, daß auch beim Krebs eine Umwandlung der Formen bei Muskelarbeit mittels Ca^{2+} bzw bei Hormonausschüttung mittels Mg^{2+} + ATP zustande kommt. Die Vermehrung der Phosphorylase a im Schwanzmuskel nach aktivem Schwimmen stimmt mit den Ergebnissen, die an Wirbeltiermuskeln nach elektrischer Reizung gefunden wurde, überein (DANFORTH et al. 1962; POSNER et al. 1965). Im Hummermuskel fanden COWGILL und CORI (1955) allerdings die Phosphorylase nach normalem aktiven Schwimmen der Krebse hauptsächlich in der b-Form vor.

Eine Aktivitätssteigerung der Gesamtphosphorylase in vitro etwa um den Faktor 5 ist von COWGILL (1959) bei Lagerung von Hummerhomogenaten gefunden worden. COWGILL (1959) führt die Vermehrung der Gesamtaktivität auf die Aktivierung einer dritten Form, der Phosphorylase c, zurück, zumal auch durch vermehrten Zusatz von AMP (20mM)

zum Bestimmungsansatz eine Aktivierung bewirkt werden konnte. Nach COWGILL handelt es sich bei der Phosphorylase c um eine Form, bei der das aktive Zentrum durch einen Zellbestandteil blockiert ist. Hohe AMP-Konzentrationen oder andere physikalische Änderungen vermögen diese Hemmung aufzuheben.

Bei Orconectes konnte nur die Zunahme der Gesamtaktivität etwa um den Faktor 2 im Muskelhomogenat nach Inkubation, nicht aber eine Aktivitätssteigerung durch vermehrten Zusatz von AMP zum Bestimmungsansatz gefunden werden. Die Erhöhung der Gesamtaktivität etwa um den Faktor 2 erinnert an die Erhöhung der Fruktose-6-Phosphat-Kinase-Aktivität nach Inkubation des Kaninchen-Muskelhomogenats und des mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällten Enzyms (PETTE und HOFER 1965). PETTE und HOFER vermuteten eine Konformationsänderung des Enzyms, eine Dissoziation eines inaktiven Komplexes.

Nach Abbildung 4 scheint die Umwandlung von Form b nach Form a und Vermehrung der Gesamtphosphorylase von gleichen Bedingungen abzuhängen. So steigt die Gesamtaktivität bei Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+}+ ATP zum Homogenat und auch die Umwandlungsgeschwindigkeit von b nach a sehr viel schneller an, wobei die beiden Prozesse andererseits nicht exakt parallel verlaufen müssen, wie aus Abbildung 4 a, b, e und f hervorgeht.

Die sehr schnelle Umwandlung der Phosphorylase b in die Phosphorylase a im Glyzerin-Puffer-Homogenat steht im Widerspruch zu den Befunden von DANFORTH et al. (1962), die unter diesen Bedingungen gerade eine Verhinderung der Umwandlung von b nach a im Froschmuskelhomogenat beobachtet haben.

es konnte gezeigt werden, daß aktives Schwimmen der Krebse einen Anstieg der Aktivität der Phosphorylase a bewirkt. Eine Erhöhung der durchschnittlichen Gesamtaktivität in vivo konnte jedoch statistisch nicht verifiziert werden ($p > 0{,}05$). Bei den Umwandlungen in vivo kommt es aber vor, daß die Gesamtaktivität etwa um das Doppelte erhöht ist gegenüber der durchschnittlichen Gesamtaktivität im Dezember, die Phosphorylase aber zum größten Teil in der

b-Form vorliegt, oder daß die Phosphorylase zum größten Teil in der a-Form vorliegt, jedoch die Gesamtaktivität nicht erhöht ist. Die Feststellung, daß nach Schwimmen gleiche Gesamtaktivitäten erreicht werden wie nach Inkubation des Muskelhomogenats und die Tatsache, daß sich die Aktivität der Gesamtphosphorylase bei gejagten Krebsen nicht wesentlich durch Inkubation mit Ca^{2+} erhöht, lassen doch die Vermutung zu, daß sich auch die Gesamtaktivität der Phosphorylase in vivo bei Muskelarbeit erhöhen kann.

Phosphorylase b: Aktivierung durch AMP, Hemmung durch ATP.

Wie bereits berichtet, ist eine Aktivierung der Phosphorylase in vivo nicht nur auf Grund der Umwandlung von b nach a denkbar, sondern auch auf Grund des Einwirkens bestimmter Nukleotide und anderer Metabolite auf die Phosphorylase b. Hier wurde nur die Aktivierung durch AMP und die Hemmung durch ATP untersucht. Auf eine Entfernung von Nukleotiden und G-6-P aus dem Rohhomogenat wurde verzichtet, da sie auf Grund der Verdünnungen des Homogenats in zu vernachlässigenden Mengen im Bestimmungsansatz vorhanden waren (ca. 7 nMol ATP, 0,2 nMol AMP und 0,1 nMol G-6-P). Die Aktivierung der Phosphorylase b durch AMP wurde bei Substratkonzentrationen von 5, 10 und 20 mM anorganischem Phosphat gemessen. Es ergaben sich Aktivierungskonstanten von $7{,}2 \cdot 10^{-5}$; $3{,}8 \cdot 10^{-5}$ und $2{,}8 \cdot 10^{-5}$ M (Abbildung 5).

Die Hemmung der Phosphorylase b durch ATP wurde bei unterschiedlichem pH ausgeführt. Es konnte aber keine Abhängigkeit der Hemmung vom pH gefunden werden, wie sie für die Hemmung der Phosphofruktokinase durch ATP nachgewiesen wurde (DANFORTH 1965). Die Hemmkonstante wurde in Gegenwart von 0,2 mM AMP und 5 mM Pi bestimmt und ergab einen Wert von ca. 3 mM ATP. Im Homogenat vorhandene ATPase-Aktivität mag diesen Wert verfälschen, obwohl die Reaktionskurve geradlinig verlief, die bei Verschwinden von ATP aus der Reaktion hätte ansteigen müssen (Abbildung 6).

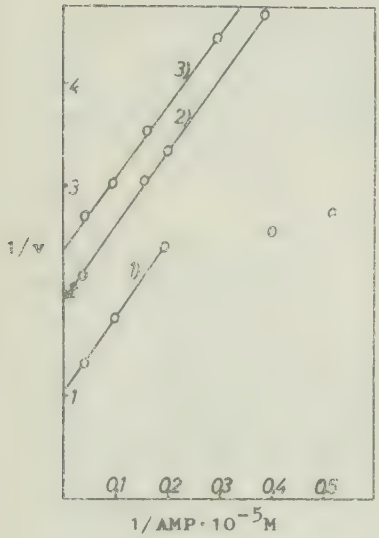


Abb. 5
Bestimmung der Aktivierungskonstanten von AMP für Phosphorylase bei 1) 5 mM Pi, 2) 10 mM Pi, 3) 20 mM Pi.
Das Abknicken der Gerade 1) bei einer Phosphatkonzentration von 5 mM und bei ca. 50 µM AMP wurde in jedem unternommenen Versuch beobachtet. Die Ursache für die relativ zur AMP-Konzentration zu hohe Umsatzgeschwindigkeit wurde nicht gefunden.
$K_a = 7{,}2 \cdot 10^{-5}$M (5 mM Pi)
$K_a = 3{,}8 \cdot 10^{-5}$M (10 mM Pi)
$K_a = 2{,}8 \cdot 10^{-5}$M (20 mM Pi)

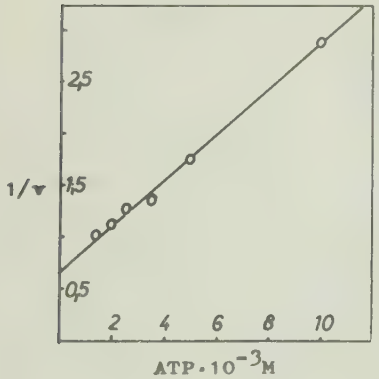


Abb. 6
Bestimmung der Hemmkonstante von ATP für Phosphorylase b bei 5 mM Pi und 0,2 mM AMP.
$K_i = 3 \cdot 10^{-3}$M

Diskussion

In Tabelle 16 sollen die Befunde von HELMREICH und CORI (1964), die an Skelettmuskeln des Kaninchens, und die von COWGILL (1959), die am Muskel des Hummers gewonnen wurden, den kinetischen Daten der Phosphorylase b dieser Arbeit gegenübergestellt werden.

	Kaninchen			Orconectes			Hummer
Pi oder G-1-P $\cdot 10^{-3}$M	Ka AMP $\cdot 10^{-5}$M	Ki ATP $\cdot 10^{-3}$M	Ki/Ka	Ka AMP $\cdot 10^{-5}$M	Ki ATP $\cdot 10^{-3}$M	Ki/Ka	Ka AMP $\cdot 10^{-4}$M
5	6,4	1,1	17	7,2	3	42	
10	4,3	0,9	21	3,8			
20	1,3			2,8			
100							4,7

Tab. 16 Aktivierungskonstanten von AMP und Hemmkonstanten von ATP für Phosphorylase b vom Kaninchenskelettmuskel (HELMREICH und CORI 1964), vom Hummermuskel (COWGILL 1959) und Orconectes (diese Arbeit) bei verschiedenen Phosphat- bzw. G-1-P-Konzentrationen.

Man sieht, daß bei Kaninchen- und Krebsmuskel -Phosphorylase b die Aktivierungskonstanten abnehmen bei Ansteigen der Phosphatkonzentration. Umgekehrt sinkt die Michaeliskonstante für die Substrate Phosphat und Glykogen bei zunehmender Konzentration von AMP, wie HELMREICH und CORI (1964) bei der Phosphorylase b des Kaninchenmuskels feststellten. Aus diesen sehr groben Befunden ist immerhin zu sehen, daß es sich bei der Phosphorylase des Krebses um ein Enzym handeln muß, dessen kinetische Eigenschaften durch bestimmte allosterische Effektoren zu beeinflussen sind, die auf Grund der nachgewiesenen Nukleotid- und G-6-P-Konzentration im Krebsmuskel (Tabelle 12) möglicherweise die Aktivität der Phosphorylase b auch in vivo beeinflussen.

Allerdings ist auch für die Phosphorylase der Wirbeltiere die Frage noch nicht eindeutig geklärt, ob die Effektoren so in den Kompartimenten der Zelle verteilt sind, daß sie überhaupt zur Wirkung am Enzym kommen können. Jedoch konnten MORGAN und PARMEGGIANI (1964) auf Grund einiger Befunde bei Wirbeltieren die Vermutung äußern: "... conversion of b to a in muscle appears only to complement glycogenolysis induced by phosphorylase b" (MORGAN und PARMEGGIANI 1964 a, S.268) und in einer anderen Arbeit: "These findings would suggest that conversion

of phosphorylase b to a is a more highly developed regulatory mechanism, sensitive to hormonal and metabolic effects, that supplements the basic regulation of phosphorylase b activity by AMP, ATP, G-6-P " (MORGAN und PARMEGGIANI 1964 b, S.2444).

Glykogen-Synthetase

Die Befunde zeigen, daß die Glykogen-Synthetase in zwei Formen im Krebsmuskel vorkommt, in einer I-Form, aktiv ohne G-6-P, und in einer D-Form, aktiv mit G-6-P.

Wie für die Glykogen-Synthetase des Rattenmuskels gefunden wurde, handelt es sich auch bei dieser Umwandlung der Formen um einem Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsprozeß. In diesem Fall ist aber die inaktive Synthetase D die phosphorylierte und die aktive Synthetase I die dephosphorylierte Form. Die Phosphorylierung der Synthetase I mit Hilfe von ATP geschieht unter der katalytischen Wirkung einer Kinase, die Dephosphorylierung mit Hilfe einer Phosphatase.

Synthetase I + nATP = Synthetase D + nADP

Synthetase D + nH_2O = Synthetase I + n Pi

Bei Wirbeltieren steht die Umwandlung der Formen unter hormonaler Kontrolle, und zwar bewirkt Insulin eine Umwandlung der D- in die I-Form (VILLAR-PALASI und LARNER 1960, DANFORTH 1965 a) und Adrenalin eine Umwandlung der I- in die D-Form (DANFORTH 1965 a). Nach Versuchen von KELLER (1967), in denen nach Augenstielablation ein Ansteigen der I-Form festgestellt wurde, ist anzunehmen, daß auch bei Krebsen die Umwandlung unter hormonaler Kontrolle steht.

Wie bereits erwähnt, kann eine Aktivierung der Glykogen-Synthetase in vivo nicht nur durch eine Umwandlung der D- in die I-Formerfolgen, sondern die Synthetase D kann wahrscheinlich auch durch Einwirken von G-6-P aktiv werden. Um diese Frage zu klären wurde die Aktivierungskonstante von G-6-P für Synthetase D bestimmt.

Zur Bestimmung der Aktivierungskonstante von G-6-P für Synthetase D wurde das Schwanzmuskelhomogenat 20

Minuten bei 20000 g , und der Überstand anschließend 3 Stunden bei 100000 g und 0°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Aktivität sowie auch der größte Teil des Glykogens befinden sich vollständig im Sediment, ein Zeichen, daß auch die Synthetase des Krebses mit dem Glykogen einen Komplex bildet, wie es bei der Synthetase der Wirbeltiere (LELOIR und GOLDEMBERG 1960) und der Synthetase der Insekten (MURPHY und WYATT 1965) der Fall ist. Das Sediment wurde in Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) 50, 5 mM EDTA-Na_2 wieder aufgenommen und die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie angegeben, allerdings mit einer Endkonzentration von 20 mM UDPG. Abbildung 7 zeigt, daß die Aktivierungskonstante von G-6-P $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ M beträgt.

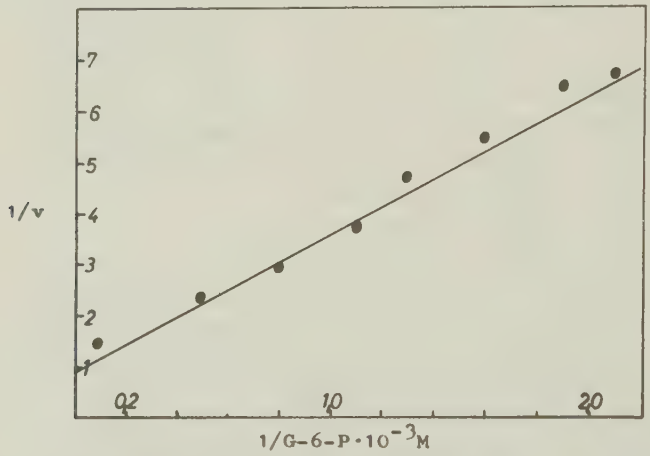


Abb. 7 Bestimmung der Aktivierungskonstante von G-6-P für Synthetase D bei einer Substratkonzentration von 20 mM UDPG. Ka = $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ M

Diskussion

Im Verhältnis zu Aktivierungskonstanten der Wirbeltiersynthetase D, bei denen eine Ka von $6 \cdot 10^{-4}$ M (LELOIR 1959) oder 2 bis $5 \cdot 10^{-4}$ M (ROSELL-PERLZ und LARNER 1964) gefunden wurde, erscheint die der Krebssynthetase groß.

Es muß aber wieder darauf hingewiesen werden, daß

hier nicht am gereinigten Enzym gearbeitet wurde und nur gezeigt werden sollte, daß im Prinzip die Synthetase D der Krebse ebenso wie die der Wirbeltiere durch allosterische Aktivatoren beeinflußt wird und daß die Ka in einer Größenordnung liegt, die eine Kontrolle der D-Form auf Grund der beobachteten G-6-P-Konzentration im Muskel (Tabelle 12) auch in vivo möglich erscheinen läßt.

d Beziehung von Glykogenkonzentration und Aktivität der Enzyme Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase im Schwanzmuskel.

In diesem Abschnitt sollen die Glykogenkonzentrationen im Schwanzmuskel den Aktivitäten der Enzyme Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase gegenübergestellt und es soll untersucht werden, welcher der in der Einleitung genannten Faktoren für die Konzentrationsänderung des Glykogens im Laufe des Jahres in Frage kommen könnte.

Die hierfür wichtigen, in den vorigen Abschnitten dargelegten Befunde, sollen kurz zusammengefaßt und in Abbildung 8 dargestellt werden.

1) Die Glykogenkonzentration ändert sich im Laufe des Jahres. Sie ist im Winter im Vergleich zum Sommer hoch (Oktober bis März: 31,8 und April bis September: 8,1 µg Glucoseäquivalente/mg Protein, durchschnittlich). Der Abfall findet im Frühling und der Anstieg im Herbst statt.
2) a. Die Gesamtaktivität der Glykogen-Synthetase ist im Winter höher als im Sommer. Der niedrigste Wert wird im April erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Glykogenkonzentration am niedrigsten.
   b. Der Anteil an "aktiver" Form Synthetase ist im Winter niedrig, steigt im April/Mai stark an und sinkt im Herbst wieder langsam ab.
3) a. Die Gesamtphosphorylase ist im Winter höher als im Sommer.
   b. Der Anteil an Phosphorylase a ist in den Monaten Januar bis Juni signifikant höher als in den Monaten Juli bis Dezember.

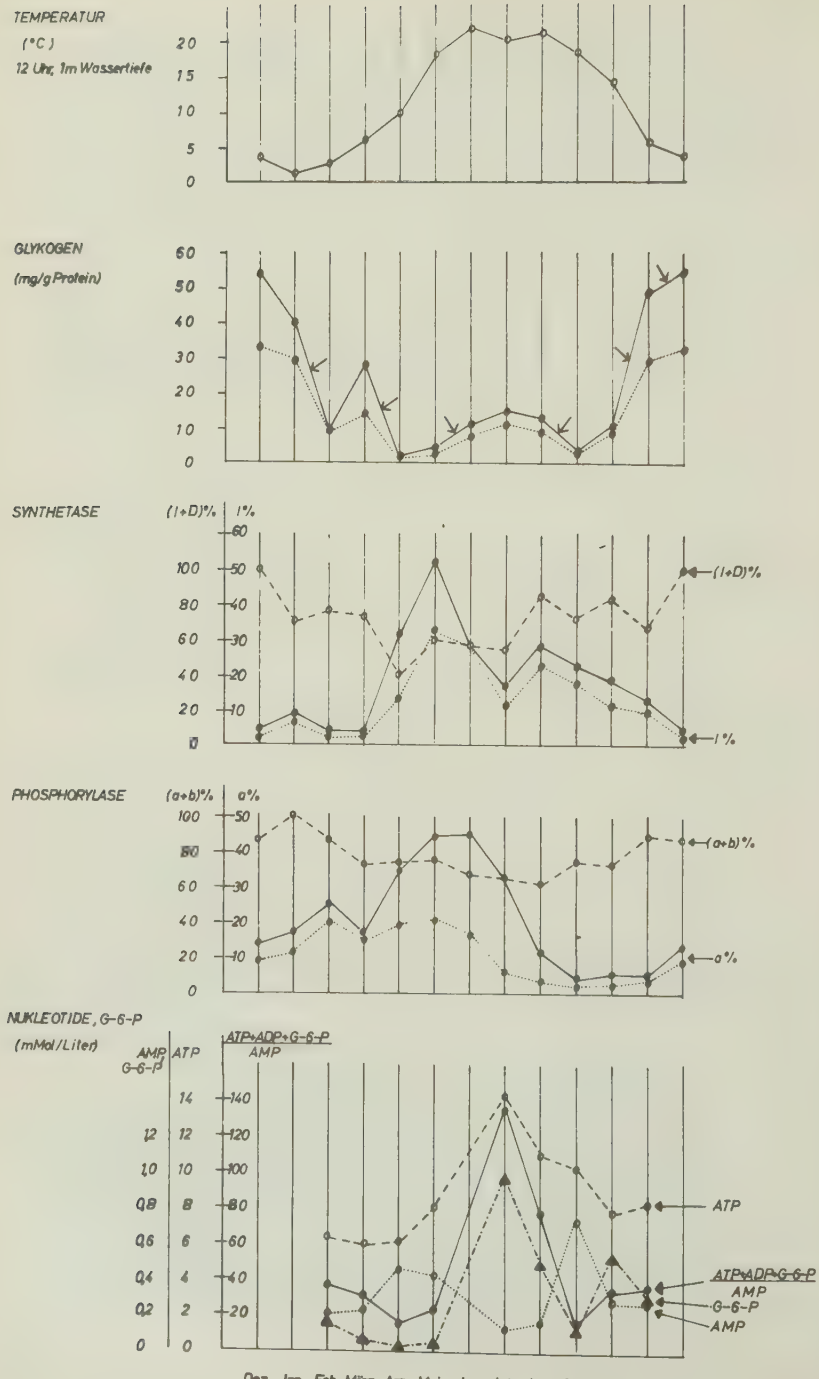

TEMPERATUR
(°C)
12 Uhr, 1m Wassertiefe
20
15
10
5
0
GLYKOGEN
(mg/g Protein)
60
50
40
30
20
10
0
SYNTHETASE
(1+D)%
I%
60
50
40
30
20
10
0
100
80
60
40
20
0
(1+D)%
I%
PHOSPHORYLASE
(a+b)%
a%
100
80
60
40
20
0
50
40
30
20
10
0
(a+b)%
a%
NUKLEOTIDE, G-6-P
(mMol/Liter)
AMP
G-6-P
ATP
ATP+ADP+G-6-P
AMP
14
12
10
8
6
4
2
0
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
140
120
100
80
60
40
20
0
ATP
ATP+ADP+G-6-P
AMP
G-6-P
AMP
Dez. Jan. Feb. März Apr. Mai Jun. Jul. Aug. Sep. Okt. Nov. Dez.

Abb. 8 Jahreszeitliche Veränderungen der Glykogen-, der Gesamtsynthetase-, der Synthetase I-, der Gesamtphosphosphorylase-, der Phosphorylase a-, der Nukleotid-, und der G-6-P- Konzentration im Schwanzmuskel des Flußkrebses.
Aufgetragen sind Synthetase I in Prozent der Gesamtsynthetase, Phosphorylase a in Prozent der Gesamtphosphorylase, die Gesamtsynthetase und die Gesamt phosphorylase in Prozent des höchsten Monatswertes. Nukleotide und G-6-P sind angegeben in mMol/Liter intrazelluläres Wasser. Bei der Glykogenkonzentration, der Synthetase I% und der Phosphorylase a% werden zusätzlich zu den arithmetischen (●———●) die geometrischen (●·····●) Mittel angegeben. Ein Pfeil zeigt signifikante Veränderungen der Glykogenkonzentration an.

4) Die Konzentrationen der allosterischen Effektoren G-6-P, ATP, ADP und AMP ändern sich im Laufe des Jahres und zwar in Größenordnungen, die nach den kinetischen Daten der "inaktiven" Form der Enzyme für eine Beeinflussung der Aktivität in vivo von Bedeutung sein könnte.

Im Folgenden sollen nur die signifikanten Glykogenkonzentrationsänderungen betrachtet werden, für die einigermaßen stichhaltige Erklärungen angeboten werden können, also die Glykogenabnahmen im April und Sep tember und die Glykogenvermehrung im November/Dezember.

Der starke Abfall der Glykogenkonzentration im April könnte durch eine Verminderung der Synthese gegenüber dem Abbau oder aber durch eine Vermehrung des Glykogenabbaus gegenüber der Synthese zustande kommen.

Die Gesamtaktivität der Synthetase ist im April stark vermindert. Die Synthetase I nimmt jedoch prozentual und absolut in dieser Zeit zu. Für die Monate Dezember, Januar, Februar und März sind die Monatsmittel der Synthetase I nicht von 0 verschieden, während sie für die übrigen Monate mit $p \leq 0{,}05$ von 0 verschieden sind. Da eine Beeinflussung der Synthetase D durch G-6-P aber auch schon im März auf Grund der geringen Konzentrationen nicht stattgefunden haben konnte, kann die Abnahme der Gesamtsynthetase nicht der Grund für die Abnahme der Glykogenkonzentration im April sein.

Es scheint im Gegenteil eine inverse Beziehung von Synthetase I und Glykogenkonzentration im Muskel zu bestehen. In Abbildung 9 wurde die Synthetase I in Prozent der Gesamtaktivität als Funktion der Glykogenkonzentration im Laufe des Jahres eingezeichnet. Trägt man nicht die Meßwerte, sondern deren Logarithmen auf, und berechnet aus den Logarithmen den Korrelationskoeffizienten, so ergibt sich eine umgekehrte lineare Beziehung von log Glykogen und log Synthetase I% mit einem r von -0,53, der bei einem Freiheitsgrad von 73 signifikant von 0 verschieden ist ($p < 0{,}001$). Durch Entlogarithmieren der beiden Regressionsgeraden $Y = 1{,}6763 - 0{,}4491X$ und $X = 1{,}5829 - 0{,}6300Y$, erhält man die Hyperbeln, die die Beziehung von Glykogen und Synthetase I% im Mittel be-

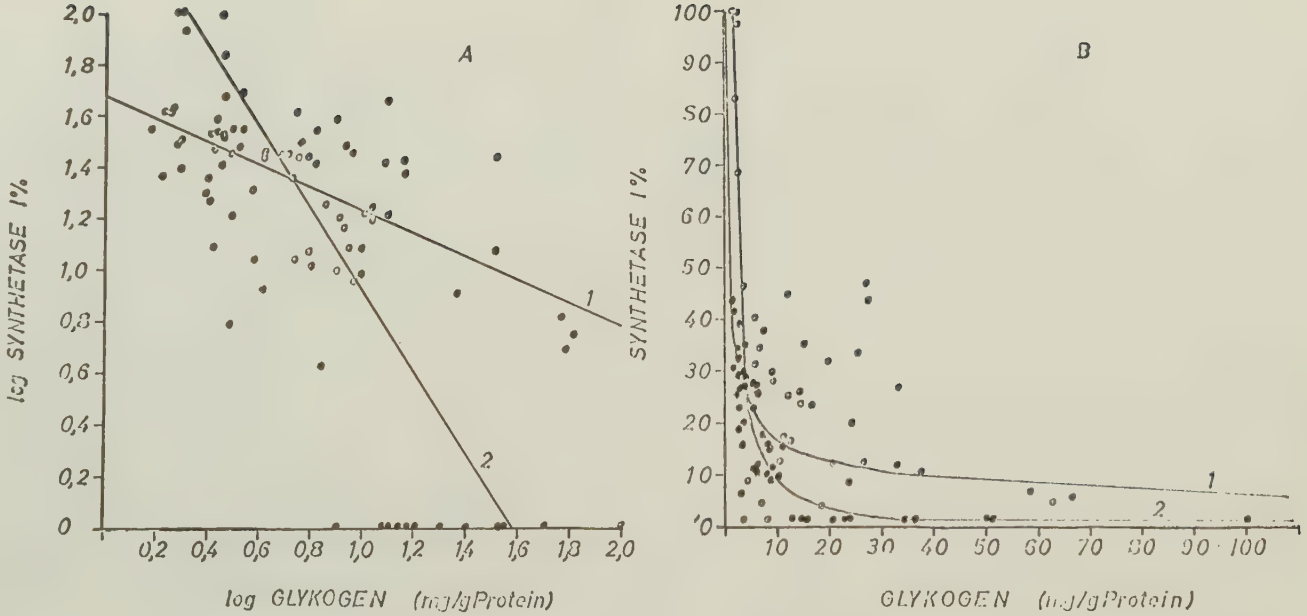


Abb. 9 Abhängigkeit der Synthetase I in % von der Gesamtsynthetase von der Glykogenkonzentration.

A. Aufgetragen wurden die Logarithmen der Glykogenkonzentration und die der Synthetase I %.
B. Aufgetragen wurden die Numeri der Glykogenkonzentration und die der Synthetase I %.

schreiben.

Die soeben gezeigten Befunde machen deutlich, daß eine Abnahme der Synthetaseaktivität nicht die Ursache für das Sinken der Glykogenkonzentration sein kann; die Ursache muß in einer Zunahme der Phosphorylaseaktivität gesucht werden.

Wie Abbildung 8 zeigt, ist das arithmetische Monatsmittel der Phosphorylase a% im April höher als im Mai. Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht zu sichern. Es ist auch fraglich, ob die arithmetischen Monatsmittel der Phosphorylase a , die in Abbildung 8 und Tabelle 10 angegeben sind, die Verhältnisse angemessen beschreiben. Es handelt sich, wie bereits erwähnt um schiefe Verteilungen, und nach GEBELEIN und HEITE (1951) kommt in solchen Fällen dem geometrischen Mittel als Medianwert bevorzugte Bedeutung zu. Arithmetisches und geometrisches Mittel weichen in den Monaten April, Mai, Juni, Juli stark voneinander ab(Abbildung 8) ; ein Zeichen dafür, daß in diesen Monaten nicht der durchschnittliche Gehalt an Phosphorylase a steigt, sondern daß die Verteilungen schiefer werden, d.h. bei prozentual nur geringer Anzahl von untersuchten Krebsen ist die Umwandlung von b nach a wesentlich vollständiger. Mit dem t-Test kann gezeigt werden, daß alle geometrischen Mittel von 0 verschieden sind, daß aber nur die von Februar und März mit $p < 0{,}05$ über 10 % liegen.

Im Herzen von Orconectes sind die Verhältnisse ähnlich wie im Schwanzmuskel. Hier erfolgt ebenfalls im April eine starke Glykogenabnahme (Abbildung 10). Eine Aktivierung der Phosphorylase durch Formenumwandlung kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, denn die Phosphorylase ist im Frühjahr, Sommer und Herbst in der "inaktiven"Form. Es liegt also nahe an eine Aktivierung der Phosphorylase b durch allosterische Effektoren zu denken.

Unter der Annahme, daß im Muskel im Wesentlichen der Abbau von Glykogen durch das Enzym Phosphorylase katalysiert wird,könnte die Ursache für die Glykogenabnahme nur noch in einer Aktivierung der "inaktiven" Form, der Phosphorylase b,liegen. Aus den Aktivierungskonstanten von AMP für Phosphorylase b geht hervor, daß die Phosphorylase bei

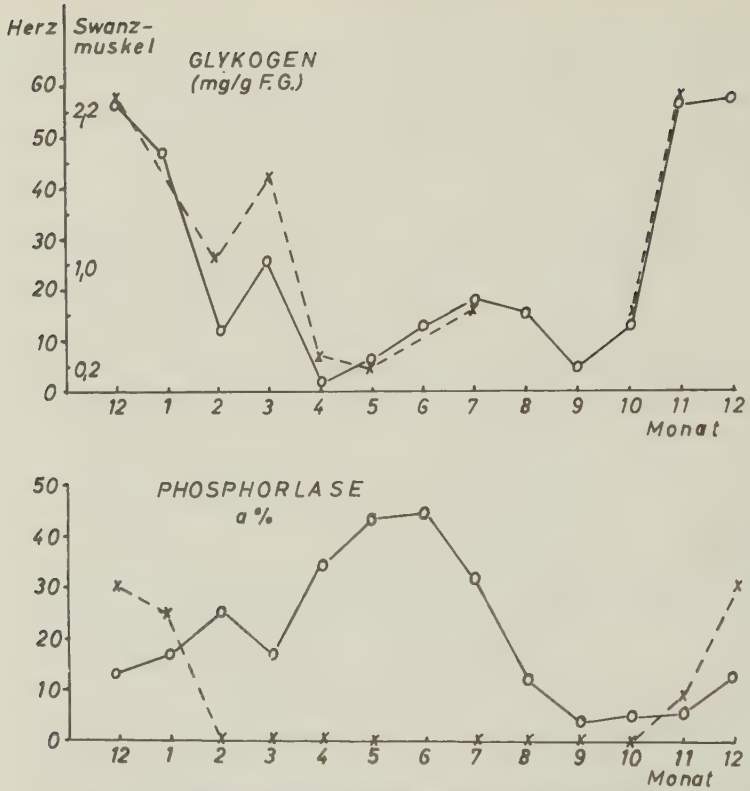


Abb. 10 Vergleich von Glykogen und Phosphorylase a % in Herz- und Schwanzmuskel.
Die monatlichen Glykogenkonzentrationen im Herz wurden von SPECK (1967) bestimmt.
o————o Schwanzmuskel, x- - - -x Herz

den im Winter vorkommenden AMP-Konzentrationen im Schwanzmuskel zu 60 bis 90 % aktiv wäre, wenn nicht das gleichzeitig vorhandene ATP dieser Aktivierung entgegenwirkte. Nach den Befunden dieser Arbeit könnte bei einem Verhältnis von 7 mM ATP zu 0,2 mM AMP eine Aktivierung der Phosphorylase b von 20 bis 30 % angenommen werden (Abbildung 6). Unter der Voraussetzung, daß auch beim Krebs G-6-P und ADP die Phosphorylase b hemmen, sind weniger als 20 % der Phosphorylase b im Winter aktiv.

Es ist anzunehmen, daß eine Verdoppelung der AMP-konzentration und damit eine Veränderung des Verhältnisses von Inhibitoren (ATP, ADP,G-6-P) zu Aktivator (AMP) zu Gunsten der Aktivatoren, wie sie im April auftritt, eine Aktivierung der Phosphorylase b zur Folge hat.

Die Bedeutung der Aktivierung der Phosphorylase b durch Verminderung des Verhältnisses von Inhibitoren zu Aktivator für eine Minderung der Glykogenkonzentration wird auch durch die Befunde im September unterstützt: Wieder ist ein signifikanter Glykogenabfall von einer Verminderung des Verhältnisses Inhibitoren zu Aktivator begleitet (Abbildung 8). Zu diesem Zeitpunkt ist die Phosphorylase a im Schwanzmuskel in sehr geringer durchschnittlicher Konzentration vorhanden, so daß in diesem Fall die vermehrte Aktivierung der Phosphorylase durch Formenumwandlung mit Sicherheit auszuschließen ist.

Leider wurden die Konzentrationen der genannten Effektoren im Herz nicht bestimmt, so daß für den hier stattfindenden Glykogenabfall noch keine Erklärung gegeben werden kann. Die zeitlich synchron verlaufenden Änderungen der Glykogenkonzentration in Herz und Schwanzmuskel (Abbildung 10) lassen immerhin gleiche Ursachen der Enzymaktivitätsbeeinflussung möglich erscheinen.

Im Schwanzmuskel ist die Phosphorylase in den Monaten Oktober/November zum größten Teil in der b-Form, das Verhältnis von Inhibitoren zu Aktivator ist wieder gestiegen, die Glykogen-Synthetase ist noch zu ca. 20 % in der aktiven Form, die G-6-P-Konzentration ist in diesen Monaten relativ hoch. Der Anstieg des Glykogens im Oktober/ November könnte durch diese Befunde zu erklären sein.

Einleitend wurde schon darauf hingewiesen, daß nur Änderungen der Glykogenkonzentration mit Änderungen der Enzymaktivität verglichen, nicht aber eine Quantifizierung dieser Änderungen vorgenommen werden konnte. Es kann nur darauf hingewiesen werden, daß sehr kleine Konzentrationsänderungen von mehreren simultan wirkenden allosterischen Inhibitoren bzw. Aktivatoren ausreichen, um die Aktivität eines Enzyms außerordentlich stark zu beeinflussen: Die Wirkung der einzelnen Effektoren am Enzym summieren oder multiplizieren sich und die Form

der Aktivierungskurve allosterischer Enzyme ist sigmoid und nicht hyperbolisch, wodurch in bestimmten Bereichen bei kleinster Änderung der Substratkonzentration die Enzymaktivität um Vieles vermindert bzw. gesteigert wird (DANFORTH 1965 b).

Summarisch kann festgestellt werden, daß bei der Regulation der sich ändernden Glykogenkonzentration im Muskel Umwandlung der "aktiven" und "inaktiven" Formen und Beeinflussung der "inaktiven" Formen durch allosterische Effektoren des glykogen synthetisierenden und des glykogen abbauenden Enzyms eine Rolle spielen.

Dieses Beispiel zeigt deutlich, daß die quantitative Bedeutung von Stoffwechselvorgängen nicht eindeutig durch Maximalaktivitäten beschrieben wird, sondern daß die Aktivitäten in vivo durch Faktoren bestimmt werden, die nicht in die unter optimalen Bedingungen stattfindenden Messungen eingehen.

Diskussion

Die inverse Beziehung von Glykogenkonzentration und Synthetase I-Aktivität im Schwanzmuskel des Krebses erinnert an die Befunde von DANFORTH (1965 a). Er beobachtete bei elektrischer Reizung von Rattenbeinmuskeln in situ bei Abfall der Glykogenkonzentration einen Anstieg der Synthetase I, der nicht durch die Reizung direkt, sondern als Folge der Glykogenabnahme eintrat. Man kann vermuten, daß auch beim Krebs die Aktivität der Synthetase I in einem negativen "feedback"-Mechanismus durch die Konzentration des eigenen Syntheseproduktes reguliert wird. Das vereinzelte Auffinden von Winterkrebsen mit Glykogenkonzentrationen, vergleichbar denen im Frühjahr und entsprechend höherem Prozentsatz an I-Form, unterstützt diese Deutung.

Der Abfall der Aktivität der Glykogen-Synthetase bei gleichzeitigem Abfall der Glykogenkonzentration im April könnte mit den Befunden von WANG und SCHEER (1963) in Zusammenhang gebracht werden. Sie stellten fest, daß Augenstielextrakt von Krebsen in bestimmten Häutungsstadien die Synthetase

I+D hemmt. Und zwar setzt die Hemmung im späten Zwischenhäutungsstadium ein (C4), erreicht ein Maximum im frühen Vorhäutungsstadium (D2) und ist kurz vor der Häutung einer geringen Aktivierung gewichen.

Da die Gastrolithenbildung bei Orconectes ca. Mitte Mai einsetzt und nach McWHINNIE und KIRCHENBERG (1962) hier das Stadium D beginnt, sind die Tiere im April als Krebse im späten Zwischenhäutungsstadium (C4) anzusehen und die Abnahme der Gesamtaktivität könnte auf das Wirken eines Augestielfaktors zurückzuführen sein. Es ist aber erstaunlich, daß eine Abnahme der Gesamtaktivität nicht auch vor der zweiten Häutung, etwa im August, zu beobachten ist.

Nach Befunden bei Wirbeltieren wird die Abnahme der Synthetase I+D als Folge einer Glykogenabnahme angesehen: SIE et al. (1964) beobachteten Abnahme der Synthetase I+D-Aktivität nach Fasten. Der Abfall konnte durch Glucose- oder Cortisolgabe rückgängig gemacht werden. CRAIG und LARNER (1964) stellten eine Abnahme der I- und Gesamtaktivität im Diaphragmamuskel von Ratten nach Adrenalingabe, bei gleichzeitigem Absteigen der Phosphorylase a-Aktivität und unveränderter Phosphoglucomutase -Aktivität, fest.

Es ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu sagen, ob die Zunahme der Synthetase nach Vermehrung von Glykogen im Mai unter dem Gesichtspunkt einer Induktion, also eines durch Gentätigkeit hervorgerufenen Vorganges, betrachtet werden darf, wie es an Hand der Befunde der Wirbeltiersynthetase versucht wurde (STEINER 1964).

Die Umwandlung der Phosphorylaseformen kann beim Krebs wie bei den Wirbeltieren auf Grund zweier Mechanismen erfolgen: Wirkung von Augenstielhormon (KELLER 1965) und Wirkung von Muskelkontraktion. Die große Streuung der Phosphorylase a-Werte im Frühling und Sommer und das gleichzeitige Vorliegen der Herz-Phosphorylase in der "inaktiven" Form, lassen den Verdacht entstehen, daß die Vermehrung von Phosphorylase a im Schwanzmuskel zumindest nicht allein auf Grund hormonaler Wirkung

sondern auch auf Grund einer gesteigerten Muskelaktivität zustande kommt.

Im Wirbeltiermuskel sind nicht nur Abnahme der Glykogenkonzentration mit Anstieg der Synthetase I und umgekehrt, sondern auch Anstieg der Glykogenkonzentration mit Anstieg der Phosphorylase a und umgekehrt korreliert (DANFORTH 1965 b). Die letztere Beziehung oder eine andere konnte für den Krebsschwanzmuskel bei der Korrelation der Wertepaare Phosphorylase a und Glykogenkonzentration nicht gefunden werden. Im Krebsherz ist allerdings die Phosphorylase im Winter, also zur Zeit verstärkter Glykogenansammlung, aktiver als im Sommer (Abbildung 10).

Auf Grund dieser Befunde ist festzustellen, daß im Schwanzmuskel des Krebses wie im Muskel von Wirbeltieren die Glykogenkonzentration die Glykogensynthese kontrolliert. Dafür aber, daß sie auch den eigenen Abbau kontrolliert, wie es bei den Wirbeltieren der Fall ist, sind noch keine Anhaltspunkte vorhanden.

An Hand der bekannten Verhältnisse im Muskel sind Änderungen der Nukleotid- und G-6-P-Konzentration auf verschiedene Ursachen zurückzuführen.

1. Muskelarbeit: Zunahme von AMP, ADP, G-6-P, Pi und Abnahme von ATP zeigt sich nach elektrischer Stimulierung im Sartoriusmuskel des Frosches (HELMREICH und CORI 1964), nach Spontanaktivität in den Beinmuskeln von Locusta (KIRSTEN 1963) und im Schwanzmuskel von Orconectes (diese Arbeit).
2. Hormoneinfluß: Adrenalin bewirkt am durchströmten Rattenherzen Anstieg von AMP, ADP, Pi und eine Abnahme von ATP (WILLIAMSON 1965). Anstieg von G-6-P und Abnahme von Pi bewirkt Adrenalin im Sartoriusmuskel des Frosches (HELMREICH und CORI 1966; KARPATKIN et al. 1964). Insulin verursacht im Rattenherz Vermehrung von G-6-P, ATP und Abnahme von AMP, ADP (WILLIAMSON 1965) und im Skelettmuskel Abnahme von G-6-P (OZAND und NARAHARA 1964).

Erst weitere Versuche, wie Exstirpation von Augenstielen bzw. Injektion von Augenstielextrakt könnten zeigen, ob auch bei Krebsen die Nukleotidkonzentration durch Hormone zu beeinflussen ist, und ob und welche der

hier genannten Ursachen die jahreszeitlichen Konzentrationsveränderungen im Schwanzmuskel hervorrufen.

Auffällig ist das Ansteigen der ATP-Konzentration in den Sommermonaten. Diese Tatsache, die höhere Konzentration an Phosphorylase a und die höhere Konzentration an Synthetase I bei relativ niedriger Glykogenkonzentration könnte als ein Zeichen eines verstärkten Stoffwechsels gewertet werden, bei dem im größerem Umfang energiereiches Phosphat gebildet wird. Ähnliche Befunde ergeben sich bei Untersuchungen der ATP-Konzentration in der Flügelepidermis und im Fettkörper von Hyalophora cecropia: In der Diapause, dem Stadium verminderter Stoffwechselintensität sind die ATP-Konzentrationen um den Faktor 2 geringer als im frühen adulten Stadium (CAREY und WYATT 1963).

2 Trehalosestoffwechsel

a Aktivitätsbestimmungen der Enzyme Trehalosephosphat-Synthetase und Trehalase.

Nach dem Enzym Trehalosephosphat-Synthetase wurde in den Organen Mitteldarmdrüse, Herz, Hypodermis und Schwanzmuskel zu verschiedenen Zeiten, besonders zur Zeit der Trehalosevermehrung im Schwanzmuskel, gesucht und keine Aktivität gefunden. In Analogie zu den Insekten, bei denen die Trehalosephosphatsynthese im Fettkörper stattfindet (CLEGG und EVANS 1961), könnte vermutet werden, daß die Synthese bei Orconectes in der Mitteldarmdrüse abläuft, daß aber keine Aktivität wegen proteolytischer Zersetzung während des Homogenisierens gefunden wurde.

Die Aktivitäten der Trehalase in den Organen sind in Tabelle 17 dargestellt.

b Eigenschaften der Trehalase.

Da die Trehalase meines Wissens bei Krebsen noch nicht gefunden worden ist, wurde eine oberflächliche Charakteri-

	MD	AD	Hy	ED	Ma	SM	He
Trehalase	1,9	4,8 1,8	46,0 7,3	4,7 1,7		1,6 0,9	19,3 3,7
Maltase	85,2 4,0	9,8 1,6	1,0	5,1	6,7	1,3	1,1

Tab. 17 Aktivitäten der Trehalase und Maltase in einigen Organen (nMol Glucose/mg Protein·min). Bei der Trehalase sind die angegebenen Aktivitäten Durchschnitte der Werte in den Monaten Dez., Jan., Juni, Sep., bei der Maltase in den Monaten Juni, Juli. In einigen Fällen wurde nur eine Messung ausgeführt, in anderen betrug N zwischen 5 und 10.
Die obere Zahl bedeutet $\bar{x}$, die untere s.

sierung versucht.

Neben Trehalose wurde Maltose, Saccharose und Raffinose als Substrate benutzt, um über die Spezifität des Enzyms Aussagen machen zu können. Man sieht aus den Säulendiagrammen (Abbildung 11), daß die maltosespaltende Aktivität eine ganz andere Organverteilung hat als die trehalosespaltende Aktivität. Mit Saccharose und Raffinose wurde kein Umsatz beobachtet.

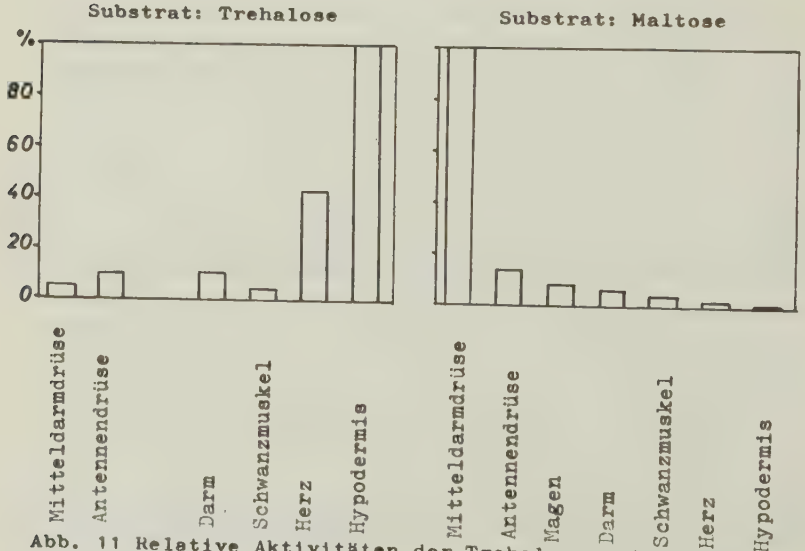


Abb. 11 Relative Aktivitäten der Trehalase und der Maltase in einigen Organen.

Durch fraktionierte Zentrifugation konnte gezeigt werden, daß die Trehalase wenigstens zum Teil membrangebunden ist, die Maltase zum großen Teil im 100000 g Überstand des Mitteldarmdrüsenhomogenats verbleibt (Tabelle 18).

	Trehalase (Hypodermis)		Maltase (Mitteldarmdrüse)	
	Gesamtakt.	spez.Akt.	Gesamtakt.	spez.Akt.
Rohhomogenat	230	8,3	5335	108,9
250 g, 5 Min.	69	6	158	41,5
18000g, 20 Min.	76	39,1	265	62,3
100000g, 30 Min. Überstand	23	9,2	208	105
	24	1,9	6130	179,5

Tab. 18 Verteilung der Trehalase und Maltase in den Zellfraktionen. Angegeben ist die Gesamtaktivität (nMol/min) und die spezifische Aktivität (nMol/mg Protein·min). Das Gewebe wurde in Phosphatpuffer (pH 6,5) 57 mM homogenisiert. Die jeweiligen Rückstände wurden 2 mal mit Puffer gewaschen.
Die spezifische Aktivität der Trehalase ist deshalb so niedrig, weil sich das Tier kurz vor der Häutung befand und unter den Kiemendeckeln schon der neue, noch nicht calcifizierte Carapax gebildet war, der zusammen mit der darunter liegenden Hypodermis verarbeitet wurde.

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte am 20000 g Sediment des Hypodermishomogenats, für Maltase am Rohhomogenat der Mitteldarmdrüse. Für Trehalase ergab sich ein pH-Optimum von 4,5, für Maltase von 5,0 (Abbildung 12).

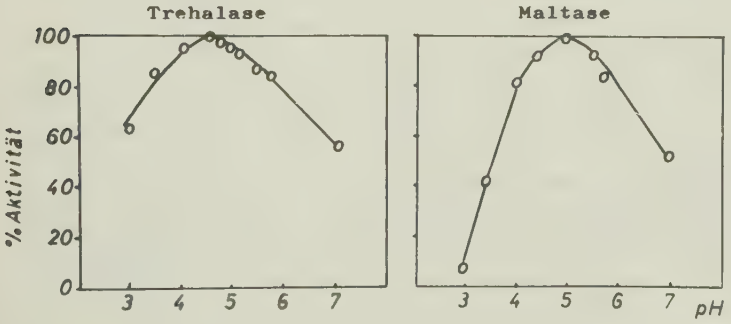


Abb. 12 Legende siehe folgende Seite

Legende zu Abb. 12: Abhängigkeit der Aktivität der Trehalase und der Maltase vom pH.
Die Hypodermis (Trehalase) und die Mitteldarmdrüse (Maltase) wurden in Wasser homogenisiert. Die Bestimmungsansätze bestanden aus:

1) Trehalase	McIlvaine-Puffer	45 mM
	Trehalose	20 mM
2) Maltase	McIlvaine-Puffer	75 mM
	Maltose	10 mM

Die Michaeliskonstante für Trehalose beträgt 1,4 mM. Sie wurde mit dem 20000 g Sediment des Hypodermishomogenates ermittelt (Abbildung 13).

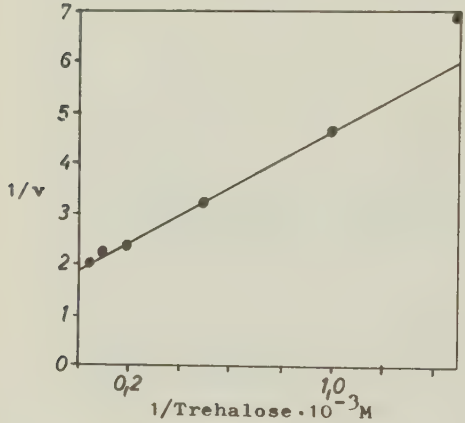


Abb. 13
Bestimmung der Michaeliskonstante von Trehalose für Trehalase.
Bedingungen: Phosphat-Puffer pH 5,8, 25°C
Km = $1{,}4 \cdot 10^{-3}$ M

Diskussion

Das Aktivitätsmuster der Trehalase bei Orconectes ist insofern bemerkenswert, als bei den Insekten Trehalase zwar in vielen Organen nachgewiesen wurde, oft mit hohen Aktivitäten im Vorderdarmepithel, aber nie in der Hypodermis (FLORKIN und JEUNIAUX 1964).

Ob die Trehalase der Hypodermis ausschließlich membrangebunden istund nur durch die nicht schonende Homogenisation mit Phosphat-Puffer (SCHNEIDER 1959) Aktivität in den Überstand geht, ist nicht zu entscheiden. ZEBE (1959) fand im Thoraxmuskel der Schabe Leucophaea

maderae eine mitochondriengebundene Trehalase. Die Untersuchungen von GUSSIN und WYATT (1965) am Muskel der Seidenraupe Hyalophora cecropia ergaben ebenfalls eine strukturgebundene (Mikrosomenfraktion) Trehalase. Befunde am Darm der Larve dieser Seidenraupe zeigten eine lösliche Trehalase, die sich auch in anderen Eigenschaften (Km, pH-Optimum) von der membrangebundenen Form unterscheidet. HANSEN (1966) fand eine lösliche und eine membrangebundene Form im Flugmuskel der Fliege Phormia regina, die sich jedoch nicht in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden.

Abschließend sollen einige Michaeliskonstanten und Angaben über pH-Optima in Tabelle 19 gegenübergestellt werden.

Objekt	Km (10^{-4} M)	pH-Opt.	Literatur
Galleria mellonella	1,3	5,5	1
Bombyx mori	4,4	5,2	2
Phormia regina	6,7	5,6	3
Hyalophora cecropia			4
1. löslich	3,6	5,8	
2. membrangebunden	30,0	6,5	
Neurospora	2,7	5,5	5
Bäckerhefe	4,1	5,6	6
Orconectes limosus	14,0	4,5	7

Tab. 19 Michaeliskonstanten und pH-Optima einiger Trehalasen.
Literatur: 1 KALF und RIEDER (1958)
2 SAITO (1960)
3 FRIEDMAN (1960)
4 GUSSIN und WYATT (1965)
5 HILL und SUSSMAN (1963)
6 PANEK und SONZA (1964)
7 Diese Arbeit

c Orientierende Messungen der Aktivität der Trehalase in einigen Monaten und einigen Organen.

Die Aktivität der Trehalase wurde in einigen Monaten für die Organe Schwanzmuskel, Herz, Antennendrüse, Enddarm und Hypodermis bestimmt (Tabelle 20).

	AD	Hy	SM	He	ED
Dezember		47,5 9,5			3,6
Januar	2,5	39,4	0,6		3,7
April	3,9	105,8 13,8	2,0	13,8	6,3
Mai	5,4 1,0	68,7 13,3	1,7 0,5	19,0 3,0	3,8 1,2
Juni	7,0	49,3		20,9	6,9
September		46,5 4,7	1,6 0,9	21,6 0,9	

Tab. 20 Aktivität der Trehalase (nMol Glucose/mg Protein·min) in einigen Monaten.
Die obere Zahl bedeutet $\bar{x}$, die untere s (N= 1 bis 5).
Abkürzungen: AD=Antennendrüse, Hy=Hypodermis, SM=Schwanzmuskel, He=Herz, ED=Enddarm

In der Hypodermis findet ein deutlicher Anstieg der Aktivität der Trehalase im April statt. Im Schwanzmuskel ist die Aktivität sehr niedrig. Es sieht so aus, als ob hier wie auch in den übrigen Organen die Aktivität im Laufe des Jahres unverändert bleibt.

d Bedeutung und Regelung der Trehalosekonzentration im Muskel.

In Tabelle 11 wurde bereits gezeigt, daß im Schwanzmuskel sehr viel mehr Glucose in Form von Oligosacchariden, die in einigen Monaten bis zu 90 % aus Trehalose bestehen (SPECK 1967), als in Form von Glykogen gespeichert wird.

In Tabelle 21 sind die Werte der Kohlenhydratkonzentration (mg Glucose/g F.G.) im Schwanzmuskel und zusätzlich die Werte der Konzentration von "löslichem" Kohlenhydrat im Blut (mg Glucose /100 ml Blut) angegeben. Der Anteil der Trehalose am "löslichen" Kohlenhydrat des Blutes schwankt im Laufe des Jahres zwischen 10 und 30 %. Die Trehalosekonzentration im Muskel ist also immer sehr viel höher als die im Blut. So beträgt sie im Winter ca.

20 bis 50 g/l intrazelluläres Muskelwasser und im Blut 0,007 bis 0,02 g/l. Hierfür sind zwei Deutungen möglich: 1. Im Muskel findet Trehalosesynthese statt, die aber auf Grund methodischer Mängel nicht festgestellt wurde, oder 2. an der Muskelmembran findet aktiver Trehalosetransport statt.

In der Flugmuskulatur der Fliege Phormia regina sind die Verhältnisse gerade umgekehrt wie beim Krebs. Hier hat die Flugmuskulatur eine Trehalosekonzentration von 0,3 g/l intrazelluläres Wasser und das Blut eine Konzentration von 10 bis 30 g/l (CLEGG und EVANS 1961). In der Flugmuskulatur konnte keine Synthese von Trehalose nachgewiesen werden, und CLEGG und EVANS (1961) nahmen daher einen Transport von Trehalose durch die Muskelmembran an. Auch DUCHÂTEAU-BOSSON et al. (1963) postulierten einen Transport von Trehalose aus der Hämolymphe in den Muskel von Bombyx mori.

	Schwanzmuskel			Blut
	Polysacch.	Oligosacch.	Glucose	Oligosacch.
Januar	1,83	22,34	0,76	
Februar	0,43	12,57	1,60	4,5
März	1,29	16,28	1,00	25,6
April	0,09	0,55	0,55	2,1
Mai	0,21	0,66	0,96	8,1
Juni	0,50	2,52	0,08	7,3
Juli	0,68	1,78	0,07	5,7
August	0,59	1,61	0,14	
September	0,16	5,39	0,33	
Oktober	0,50	9,57	0,26	10,3
November	2,22	16,28	0,31	4,3
Dezember	2,48	28,95	0,85	

Tab. 21 Konzentrationen von Poly- und Oligosacchariden im Schwanzmuskel (mg Glucose/g F.G.) und Konzentration von Oligosacchariden im Blut (mg Glucose/100 ml Blut). Die Angaben für das Blut wurden der Arbeit von SPECK (1967) entnommen.

Zur Zeit ist noch nicht zu entscheiden, auf Grund welcher Mechanismen es zu dieser starken Ansammlung von Trehalose im Schwanzmuskel kommt. Der plötzliche Abfall der Konzentration im April, der nicht von einer gesteigerten Aktivität der Trehalase begleitet zu sein scheint, könnte dafür sprechen, daß es sich bei der Veränderung der Trehalosekonzentration im Muskel um ein Transportphänomen handelt.

Interessant ist, daß gerade zur Zeit der starken Abnahme von Oligosaccharid und also auch von Trehalose im Muskel die Aktivität der Trehalase in der Epidermis ansteigt. Man könnte vermuten, daß die Trehalose aus dem Muskel zur Epidermis transportiert wird und dort zur Bereitstellung von Glucose für die Chitinsynthese abgebaut wird. Jedoch finden Abfall der Trehalose im Muskel und Anstieg der Trehalase in der Epidermis bereits im April statt, zu einem Zeitpunkt also, in dem noch keine Anzeichen von Häutungsvorbereitungen zu bemerken sind. Auch die Chitinsynthese findet nach MEENAKSHI und SCHEER (1961) erst nach der Häutung, in den Stadien A und B , statt. Andererseits beginnt zu dieser Zeit in der Hypodermis die Glykogenkonzentration zu steigen (RENAUD 1949; SPECK 1967) und ein Umbau von körpereigener Trehalose zu Glykogen, das seinerseits bei der Häutung zu Chitin umgebaut wird (RENAUD 1949), wäre denkbar. Da aber vor der zweiten Häutung (Juli/August) kein Trehalosedepot im Muskel angelegt wird, die vorhandene Trehalose nicht abgebaut wird und auch die Trehalaseaktivität in der Hypodermis nicht zu- sondern abnimmt, ist es fraglich, ob die Anlegung des Trehalosedepots im Winter und die Trehaloseabnahme im April mit einer Bereitstellung von Glucose für die Glykogensynthese und also mit der Häutung, in Zusammenhang gebracht werden dürfen.

Im Blut konnte zu keiner Zeit Trehalaseaktivität gefunden werden. Bei der Seidenraupe Bombyx mori (DUCHÂTEAU-BOSSON et al. 1963) und der Fliege Phormia regina (FRIEDMAN 1961) spielt die Trehalase in der Hämolymphe eine entscheidende Rolle bei der Häutung. In den Zwischenhäutungsstadien ist sie gehemmt, so daß im Blut eine gleichbleibende Trehalosekonzentration aufrechterhalten

wird. Zur Zeit der Häutung tritt eine Aufhebung der Hemmung ein, so daß Trehalose zur Bereitstellung von Glucose für die Chitinsynthese gespalten werden kann.

Bei Bombyx mori konnte eine Trehalaseaktivität ebenfalls im Darm und Muskel aber nicht in der Epidermis nachgewiesen werden. DUCHATEAU-BOSSON et al. (1963) kamen zu dem Schluß, daß die Trehalose bei der Seidenraupe sowohl zur Energiegewinnung als auch zur Zeit der Häutung als Ausgangsmaterial für die Chitinsynthese dient.

Allgemeine Diskussion

Die Aufgabe dieser Arbeit sollte erstens darin bestehen, festzustellen, ob Glykogenese und Glykogenolyse nach dem von Wirbeltieren gewohnten Schema und ob Trehalosesynthese und Trehaloseabbau nach dem von Insekten gewohnten Schema ablaufen. Zweitens sollte die quantitative Bedeutung der Organe hinsichtlich des Glykogenstoffwechsels und des Trehalosestoffwechsels ermittelt werden. Außerdem wurde die Frage aufgeworfen, ob unter optimalen Bedingungen bestimmte Enzymaktivitäten Aufschluß über die Stoffwechselintensität geben können.

Eine Trehalosebildung über UDPG und G-6-P, den Befunden bei Insekten entsprechend, konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund bedeutet aber nicht, daß die Trehalose beim Krebs in anderer Weise gebildet wird. Methodische Mängel und die Unmöglichkeit, von der Mitteldarmdrüse zur Aktivitätsmessung brauchbare Homogenate herzustellen, lassen diese Frage weiterhin offen. Der Abbau der Trehalose erfolgt durch eine spezifische Trehalase, die eine ganz andere Organverteilung als bei den Insekten hat. Aus den Messungen der Trehalaseaktivität geht hervor, daß größere Bedeutung nur die Organe Hypodermis und Herz für den Abbau der Trehalose und damit für die Gewinnung von Glucose aus Trehalose haben dürften.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten zeigt, daß Glykogenese und Glykogenolyse beim Krebs nach dem von Wirbeltieren bekannten Schema ablaufen.

Unter der Annahme, daß die unter optimalen Bedingungen gemessenen Enzymaktivitäten ein Maß für die Stoffwechselintensität darstellen, könnte man eine Rangfolge der Organe hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Glykogenstoffwechsel von Orconectes aus den Enzymaktivitätsmustern ablesen. Nun konnte aber am Beispiel der Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase im Krebsmuskel gezeigt werden, daß die Aktivitäten einiger Schlüsselenzyme durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert werden, so daß es unmöglich erscheint, allein von den Maximalaktivitäten auf die quantitative Bedeutung eines Stoffwechselweges in vivo zu schließen.

In dieser Hinsicht wichtig könnten für den Krebs auch die Enzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase, Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase sein, die in vivo weit entfernt vom Massenwirkungsgleichgewicht operieren, wie WILLIAMSON (1965) an durchströmten Rattenherzen zeigen konnte. Verschiedene Befunde beweisen, daß für die Regulation dieser Enzymaktivitäten die Hemmung durch ATP eine wichtige Rolle spielt (HESS 1966). Auch die UDPG-Pyrophosphorylase müßte beim Krebs hinsichtlich ihrer Beeinflußbarkeit durch Nukleotide überprüft werden, da KORNFELD (1965) eine Hemmung der UDPG-Pyrophosphorylase der Leber durch AMP festgestellt hat. Im Gegensatz dazu stehen im Rattenherz Enzyme, die in der Nähe des Massenwirkungsgleichgewichts arbeiten, wie Hexosephosphat-Isomerase, Phosphoglucomutase, Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphoglycerat-Mutase und Enolase (WILLIAMSON 1965), denen offenbar keine Bedeutung für die Regulation des Glykolyseflusses zukommt.

Neben der für Orconectes gefundenen Regulierung der Enzyme Glykogen-Synthetase und Glykogen-Phosphorylase sprechen auch andere Befunde dafür, daß die maximalen Aktivitäten kaum etwas über die in vivo den metabolischen Status bestimmenden Aktivitäten aussagen. Aus Tabelle 3

geht hervor, daß die Maximalaktivitäten der Glykogen-Phosphorylase in fast allen Organen bei Krebs und Ratte höher sind als die der Glykogen-Synthetase. Da sich Glykogen aber offensichtlich ansammelt, muß die Aktivität der Glykogen-Phosphorylase normalerweise niedriger gehalten werden als die der Glykogen-Synthetase. Auf Seite 35 ist bereits gezeigt worden, daß die Maximalaktivitäten der Enzyme bei Krebs und Ratte etwa gleich groß sind, obwohl sehr große Unterschiede in der Stoffwechselintensität bestehen. Eine mögliche Ursache dafür ist bereits auf Seite 38 genannt worden. Eine zweite Ursachekann die sein, daß bei Krebs und Ratte die Kinetik der einzelnen Enzyme durch allosterische Effektoren unterschiedlich reguliert wird.

URICH (1964) hat schon darauf hingewiesen, daß die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse nicht stabil sein dürfte, sondern regulatorischen Veränderungen unterliegt. Dafür sprechen auch einige Befunde, die die Frage berechtigt erscheinen lassen, ob das Aufstellen von starren Enzymaktivitätsmustern beim Krebs nicht nur einen heuristischen Wert hat. Wie am Muskel exemplarisch gezeigt wurde, verändern sich die Aktivitäten einiger Enzyme und damit die Intensität des Glykogenstoffwechsels im Laufe des Jahres. Höchstwahrscheinlich spielt nicht so sehr eine Veränderung der Gesamtaktivität eine Rolle , als vielmehr eine Veränderung des Verhältnisses "aktive" Form/ "inaktive" Form und Veränderung der Konzentration der allosterischen Aktivatoren und Inhibitoren. Nun ist der Schwanzmuskel allerdings ein Organ, bei dem besondere Mechanismen zur unterschiedlichen Regelung der Stoffwechselintensität bei Ruhe und Aktivität zu fordern sind. Da bei den anderen Organen nicht in dem Maße unterschiedliche Aktivitätsphasen auftreten ist es fraglich, ob die für den Muskel aufgezeigten Regulationsmöglichkeiten auch dort eine Rolle spielen. Die Untersuchungen von SPECK (1967) haben allerdings gezeigt, daß nicht nur im Schwanzmuskel, sondern in allen Organen mehr oder weniger ausgeprägte Schwankungen der Glykogenkonzentration im Laufe

des Jahres auftreten. Als Ursache dafür dürften ähnliche Regulationsmöglichkeiten wie im Schwanzmuskel in Frage kommen.

Auch die Aktivitäten der Enzyme oder eines Enzyms des Pentose-phosphat-Zyklus scheinen sich im Laufe des Jahres zu ändern. Nach Befunden von McWHINNIE und KIRCHENBERG (1962) und McWHINNIE und CHUA (1964) hat der Pentose-phosphat-Zyklus in der Mitteldarmdrüse von Orconectes virilis zur Zeit der Zwischenhäutung (C3, C4) eine größere Bedeutung als in der Vorhäutung (D2 bis D4), während zur Zeit der Vorhäutung die Glykolyse verstärkt abläuft.

Da es fraglich erscheint, daß jahreszeitliche Aktivitätsveränderungen in allen Organen gleichzeitig, gleichsinnig und im gleichen Maß erfolgen, erscheint ein Bedeutungswandel der Organe hinsichtlich eines Stoffwechselweges, bzw. ein Bedeutungswandel von Stoffwechselwegen innerhalb eines Organs im Laufe des Jahres möglich. Orientierende Messungen von KELLER (unveröffentlicht), mit denen gezeigt wurde, daß der"turnover" von Glykogen je nach Jahreszeit entweder in der Mitteldarmdrüse oder im Muskel größer war, und die Feststellung von SCHWABE und SCHEER (1952), daß bei Panulirus japonicus in der Vorhäutung (Stadium D) sich in der Mitteldarmdrüse und der Epidermis das Glykogen vermehrt, im Muskel jedoch abnimmt, weisen auf ungleichsinnige Aktivitätsveränderungen in den Organen hin.

Abschließend ist zu bemerken, daß eine quantitative Bedeutung der Organe für den Glykogenstoffwechsel allein aus den Enzymaktivitätsmustern nicht abgelesen werden kann. Wie bei Wirbeltieren oder Mikroorganismen werden auch beim Krebs die Enzymaktivitäten durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert, die beim Messen unter optimalen Bedingungen nicht erfaßt werden.

Zusammenfassung

1 Die Aktivitäten von Enzymen des Glykogen- und des Trehalosestoffwechsels wurden in den Organen von Orconectes limosus untersucht.
Im einzelnen wurden die Aktivitäten der Enzyme UDPG-Pyrophosphorylase, Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase, Trehalosephosphat-Synthetase und Trehalase in den Organen Schwanzmuskel, Herz, Cerebralganglion, Antennendrüse, Enddarm, Magen, Mitteldarmdrüse, Hoden, Kiemen und Hypodermis bestimmt.

a Trehalosephosphat-Synthetase konnte, wohl auf Grund methodischer Mängel, in keinem Organ und zu keiner Zeit nachgewiesen werden.

b Die Aktivität der Trehalase ist am größten in der Hypodermis, geringer im Herz und niedrig in den Organen Antennendrüse, Enddarm, Mitteldarmdrüse und Schwanzmuskel.

c Die Aktivitäten der Enzyme Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Hexosephosphat-Isomerase und Aldolase (KELLER 1964) stehen in jedem Organ in einem konstanten Verhältnis zueinander. Die absoluten Aktivitäten (nMol/mg Protein·min) sind in den Organen Schwanzmuskel, Cerebralganglion und Herz hoch, in den Organen Mitteldarmdrüse, Magen und Kiemen niedrig.

d Das Enzym UDPG-Pyrophosphorylase verhält sich zu den anderen Enzymen in spezifischen Proportionen. Die höchste Aktivität ist im Herz, die niedrigste in den Kiemen vorhanden.

2 Die Aktivitäten der Enzyme Glykogen-Synthetase (I- und Gesamtaktivität), Glykogen-Phosphorylase (a- und Gesamtaktivität), Phosphoglucomutase und Trehalase wurden in einigen Organen in mehreren Monaten bestimmt.

a Trehalase hat im Frühjahr in der Hypodermis eine höhere Aktivität als im Winter.

b Glykogen-Synthetase, Glykogen-Phosphorylase und Phos-

glucomutase im Schwanzmuskel haben im Winter höhere spezifische Aktivitäten als im Sommer.

c Der Anteil an "aktiver" Glykogen-Synthetase ist im Winter niedrig, steigt im April/Mai stark an und sinkt im Herbst wieder langsam ab. Der Anteil an "aktiver" Glykogen-Phosphorylase ist in den Monaten Januar bis Juni signifikant höher als in den Monaten Juli bis Dezember.

3 Die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP, G-6-P, Polysaccharid, Oligosaccharid und Glucose wurden im Schwanzmuskel in mehreren Monaten bestimmt.

a Die Kohlenhydrate erreichen maximale Konzentrationen im Dezember (Glucose: 41; Oligosaccharid: 631; Polysaccharid: 54 µg Glucoseäquivalente/mg Protein) und minimale im April (Glucose: 1,8; Oligosaccharid: 12,3; Polysaccharid: 1,9 µg Glucoseäquivalente/mg Protein)

b Die AMP-Konzentration ist in den Monaten April/Mai (ca. 0,43 mM) und September (0,73 mM) hoch und in den Monaten Juli/August (ca. 0,14 mM) niedrig. Demgegenüber erreicht die G-6-P-Konzentration in den Monaten April/Mai (ca. 0,03 mM) und September (0,1 mM) minimale Werte und in den Monaten Juli/August(0,73 mM) maximale Werte. Die ATP-Konzentration ist in den Monaten Juli/August/September (ca. 12 mM) höher als in den übrigen Monaten (ca. 7 mM).

4 Die Enzyme Glykogen-Phosphorylase, Glykogen-Synthetase und Trehalase wurden näher charakterisiert.

a Inkubationsversuche zeigen die Umwandlung der Phosphorylase b in die Phosphorylase a und Zunahme der Gesamtaktivität im Muskelhomogenat. Umwandlung und Vermehrung der Gesamtaktivität verläuft wesentlich schneller bei Inkubation mit Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} + ATP.
Im aktiven Schwanzmuskel erfolgt eine Umwandlung von b nach a. Eine Vermehrung der Gesamtaktivität in vivo ist fraglich.

b Die Michaeliskonstante von AMP für Phosphorylase b ist bei 5, 10, 20 mM anorganischem Phosphat $7{,}2 \cdot 10^{-5}$, $3{,}8 \cdot 10^{-5}$, $2{,}8 \cdot 10^{-5}$ M. Die Hemmkonstante für ATP von Phosphorylase b ist $3 \cdot 10^{-3}$ M (bei 5 mM Pi und 0,2 mM AMP). Die Michaeliskonstante von G-6-P für Synthetase b

beträgt $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ M.

c Fraktionierte Zentrifugation des Hypodermishomogenats ergab die größte spezifische Aktivität der Trehalase in der Mitochondrienfraktion.
Das pH-Optimum der Trehalase beträgt 4,5; die Michaeliskonstante für Trehalose beträgt $1{,}4 \cdot 10^{-3}$ M (bei pH 5,8 und 25°C).

5 An Hand der Aktivitäten von Synthetase und Phosphorylase, der Konzentrationen von ATP, ADP, AMP, G-6-P und an Hand der Kinetik der Aktivierung und Hemmung durch allosterische Effektoren wird untersucht, ob Veränderungen der Gesamtaktivität, Formenumwandlung oder Beeinflussung der Kinetik durch allosterische Effektoren die Konzentrationsschwankungendes Glykogens im Muskel verursachen.

a Die Glykogenkonzentration bestimmt die Aktivität der Synthetase I: Abnahme von Glykogen bewirkt Zunahme von Synthetase I und umgekehrt. Glykogenkonzentration und die Aktivität der Phosphorylase a konnten nicht korreliert werden.

b Die Schwankungen der Glykogenkonzentration sind vermutlich auf Beeinflussung der Kinetik der Phosphorylase b durch allosterische Effektoren zurückzuführen.

6 Es wird diskutiert, ob Enzymaktivitätsmuster, die an Hand der unter optimalen Bedingungen gemessenen Aktivitäten aufgestellt werden, eine Aussage über die in vivo existierenden Stoffwechselverhältnisse gestatten.

LITERATURVERZEICHNIS

Die mit + gekennzeichneten Arbeiten wurden nur im Referat gelesen.

BELITZ, H.J. (1960): Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht 3, 83-103

BERGREEN, P.W., V.R. MEENAKSHI and B.T.SCHEER (1961): The oxydation of glucose by crustaceans. Comp.Biochem.Physiol.2, 218-220

+BERNARD, C.(1879): Lecons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Paris
Zit.n. KIRCH, J.B. (1886): Das Glykogen in den Geweben des Flusskrebses. Diss.Bonn

+BOYLAND, E.(1928): Chemical changes in muscle. Part 2: Invertebrate muscle. Biochem.J. 22, 362-376

BÜCHER, T. und M.KLINGENBERG (1958): Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chem. 70, 552-570

CANDY, D.J., and B.A. KILBY (1959): Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust. Nature (Lond.) 183, 1594-1595

CANDY, D.J. and B.A. KILBY (1961): The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. Biochem. J. 78, 531-536

CAREY, F.G. and G.R. WYATT (1963): Phosphate compounds in tissues of the Cecropia silkmoth during diapause and development. J.Insect.Physiol. 9, 317-335

CLEGG, J.S. and D.R. EVANS (1961): The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly. J.exp.Biol. 38, 771-792

CLEGG, J.S. (1965): The origin of trehalose and its significance during formation of encysted dormant embryos of Artemia salina. Comp. Biochem. Physiol. 14, 135-143

+CORI, G.T. and A.A.GREEN (1943): Crystalline muscle phosphorylase. II. Prosthetic group. J.biol.Chem. 151, 31-38

COWGILL, R.W. and C.F. CORI (1955): The conversion of inactive phosphorylase to phosphorylase b and phosphorylase a in lobster muscle extract. J. biol. Chem. 216, 133-140

COWGILL, R.W. (1956): Phosphorylase system in the lobster. Biol.Bull.mar.biol.Lab.Woods Hole 111, 300-301

COWGILL, R.W. (1959): Lobster muscle phosphorylase: Purification and properties. J. biol. Chem. 234, 3146-3153

COWGILL, R.W. (1959) : The conversion of lobster muscle phosphorylase a to b and phosphorylase b to a. J.biol.Chem. 234, 3154-3157

CRAIG, J.W. and J.LARNER (1964) : Influence of epinephrine and insulin on uridine diphosphate glucose- - glucan transferase and phosphorylase in muscle. Nature (Lond.) 202, 971-973

DALL, W. (1965) : Studies on the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp.. IV Carbohydrate metabolism. Aust.J.mar.Freshwat.Res. 16, 163-180

DANFORTH, W.H., E.HELMREICH and C.F.CORI (1962) : The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A. 48, 1191-1199

DANFORTH, W.H. (1965 a) : Glycogen synthetase activity in skeletal muscle. Interconversion of two forms and control of glycogen synthesis. J.biol.Chem. 240, 588-593

DANFORTH, W.H. (1965 b) : Activation of glycolytic pathway in muscle. In: CHANCE, B., R.W.ESTABROOK and J.R.WILLIAMSON (Edits) Control of Energy Metabolism. p. 287-297 New York, London: Academic Press

DEAN, J.M. and F.J.VERNBERG (1965) : Effects of temperature acclimation on some aspects of carbohydrate metabolism in decapod crustacea. Biol.Bull.mar.biol.Lab.Woods Hole 129, 87-94

DIXON, M. and E.C.WEBB (1964) :Enzymes. London: Longmans, Green and Co LTD

+DOUNCE, A., R.F.WITTER, K.J.MONTY, S.PATE and M.A. COTTONE (1955) : A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. J.Biophys.Biochem.Cytol. 1, 139

DUCHATEAU-BOSSON, G., C.JEUNIAUX et FLORKIN (1963) : Contributions a la biochimie du Ver a soie. XXVII. Tréhalose, Tréhalase et mue. Arch, int.Physiol.Biochim. 71, 566-576

FAIRBAIRN, D. (1958) : Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. Can.J.Zool. 36, 787-795

+FISKE, C.H. and P.SUBBAROW (1925): J.biol.Chem. 66, 375 Zit.n. BERGMEYER, H.-U. (Edit.) (1962) : Methoden der enzymatischen Analyse. S.790, Weinheim: Verlag Chemie

FELLENBERG, R.v., H.EPPENBERGER, R.RICHTERICH u. H.AEBI (1962) : Das glykolytische Enzymmuster von Leber, Niere, Skelettmuskel, Herzmuskel und Großhirn bei Ratte und Maus. Biochem.Z. 336, 334-350

FLORKIN, M., and Ch.JEUNIAUX (1964) : Hemolymph: Composition. In: ROCKSTEIN, M.(Edit.) The Physiology of Insecta. Vol. 3, p.109-152 New York, London: Academic Press

FRIEDMAN, S. (1960) : The purification and properties of trehalase isolated from Phormia regina Meig.. Arch.Biochem.Biophys. 87, 252-258

FRIEDMAN, S. (1961) : Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of Phormia regina Meig.. Arch.Biochem.Biophys. 93, 550-554

FRIEDMAN, D.L. and J.LARNER (1963) : Studies on UDPG- -glucan transglucosylase. III. Interconversion of two forms of muscle UDPG-α-glucan transglucosylase by a phosphorylation - dephosphorylation reaction sequence. Biochemistry 2, 669-675

GEBELEIN, H. u. H.-J. HEITE (1951) : Statistische Urteilsbildung. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer

GUSSIN, A.E.S. and G.R.WYATT (1965) : Membrane-bound trehalase from Cecropia silkmoth muscle. Arch.Biochem.Biophys. 112, 626-634

HANSEN, K. (1966) : Zur cytologischen Lokalisation der Trehalase in der indirekten Flugmuskulatur der Insekten. Biochem.Z. 344, 15-25

+HARREVELD, A.VAN (1936) :A physiological solution for freshwater Crustaceans. Proc.Soc.Exp.Biol. 43, 335-346

HASSELBACH, W. u. H.H.WEBER (1965) : Die intrazelluläre Regulation der Muskelaktivität. Naturwissenschaften 52, 121-128

HELMREICH, E., and C.F.CORI (1964) : The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A. 51, 131-138

HELMREICH, E., and C.F.CORI (1965) : Regulation of glycolysis in muscle. In: Advances in Enzyme Regulation. 3 91-119

HELMREICH, E. and C.F.CORI (1966) : E. The activation of glycolysis in frog sartorius muscle by epinephrine. Pharmac.Rev. 18, 189-196

HESS, B. u. K.BRAND (1966) : Kontrollmechanismen der Glykolyse. Helgoländer wiss.Meeresunters. 14, 129-147

HILL, E.P. and A.S.SUSSMAN (1963) : Purification and properties of trehalase (ε) from Neurospora. Arch.Biochem.Biophys. 102, 389-396

HU, A.S.L. (1958) : Glucose metabolism in the crab. Arch.Biochem.Biophys. 75, 387-395

JACOB, F. and J.MONOD (1961) : Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J.molecular Biol. 3, 318-356

KALF, G.F. and S.V.RIEDER (1958) : The purification and properties of trehalase. J.biol.Chem. 230, 691-698

KARPATKIN, S. and E.HELMREICH and C.F.CORI (1964) : Regulation of glycolysis in muscle. II. Effect of stimulation and epinephrine in isolated frog sartorius muscle. J.biol. Chem. 239, 3139-3145

KELLER, P.J. and G.T.CORI (1953) : Enzymic conversion of phosphorylase a to phosphorylase b. Biochim.biophys. Acta 12, 235-238

KELLER, R (1964) : Die Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse und des Citronensäurezyklus in den einzelnen Organen des Flußkrebses Cambarus affinis Say. Diss. Berlin

KELLER, R. (1965 a) : Die Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse und des Citronensäurezyklus in den Organen von Cambarus affinis Say (Crustacea Dekapoda). Z.vergl.Physiol. 50, 119-136

KELLER, R. (1965 b) : Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharidstoffwechsels beim Flußkrebs Cambarus affinis Say. Z.vergl.Physiol. 51, 49-59

KELLER, R. (1967) : Über eine hormonale Regulation der Glykogensynthese beim Flußkrebs Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis Say). Zool. Anz. 30Suppl., Verhdlg.d.Dtsch.Zool.Ges. Göttingen 272-279

KIRSTEN, E., R.KIRSTEN u. P.ARESE (1963) : Das Verhalten von freien Aminosäuren,energiereiche Phosphorsäureverbindungen und einigen Glykolyse- und Tricarbonsäurecyclus-Substraten in Muskeln von Locusta migratoria bei der Arbeit. Biochem.Z. 337, 167-178

KORNFELD, S. (1965) : The effect of 5'-AMP and UDP-D-glucose on UDP-glucose pyrophosphorylase activity in liver. Fed.Proc. 24, 536

KREBS, E.G. and E.H.FISCHER (1962) : Molecular properties and transformations of glykogen phosphorylase in animal tissues. In: Adv.Enzymol. 24, 263-290

KREBS, E.G., C.GONZALES, J.B.POSNER, D.S.LOVE, G.E. BRATVOLD and E.H.FISCHER (1964) : Interconversion reactions of muscle phosphorylases b and a. In: WOLSTAN, W.J. and M.P.CAMERON (Edits) Control of Glycogen metabolism. p.200-210 Ciba Foundation Symposion. London: J.& A.Churchill, LTD

KREBS, E.G., D.S.LOVE, G.E.BRATVOLD, K.A.TRAYSER, W.L. MEYER, and E.H.FISCHER (1964) : purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase. Biochemistry 3, 1022-1033

KREBS, E.G., R.J.DE LANGE, R.G.KEMP, and W.D.RILEY (1966) : B. Activation of skeletal muscle phosphorylase. Pharmac.Rev. 18, 163-171

LELOIR, L.F. and E.CABIB (1953) : The enzymic synthesis of trehalose phosphate. J.Am.chem.Soc. 75, 5445-5446

LELOIR, L.F. and C.E.CARDINI (1957) : Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. J.Am.chem.Soc. 79, 6340-6341

LELOIR, L.F. and J.M.OLAVARRIA, S.H.GOLDEMBERG and H.CARMINATTI (1959) : Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. Arch.Biochem.Biophys. 81, 508-520

LELOIR, L.F. and S.H.GOLDEMBERG (1960) : Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. J.biol.Chem. 235, 919-923

LINDER, A. (1960) : Statistische Methoden. Für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. 3. Auflage Basel, Stuttgart: Birkhäuser

+LINEWEAVER, H. and D.BURK (1934) : J.Am.chem.Soc. 56, 658 Zit.n. DIXON, M. and E.C.WEBB (1964)

LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR and R.J. RANDALL (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.biol.Chem. 193, 265-275

MADSEN, N.B. (1961) : The inhibition of glycogen phosphorylase by uridine diphosphate glucose. Biochem.biophys.Res.Comm. 6, 310-313

MANSOUR, T.E., E.W.SUTHERLAND, T.W.RALL and E.BUEDING (1960) : The effect of serotonin (5-hydroxytryptamin) on the formation of Adenosine 3',5'-phosphate by tissue particles from the liver fluke, Fasciola hepatica. J.biol.Chem. 235, 466-470

MEENAKSHI, V.R. and B.T.SCHEER (1961) : Metabolism of glucose in the crabs Cancer magister and Hemigrapsus nudus. Comp.Biochem.Physiol. 3 30-41

MEYER, W.L., E.H.FISCHER, and E.G.KREBS (1964) : Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+}. Biochemistry 3, 1033-1039

+MEYERHOF, O. u. K.LOHMANN (1928) : Über die natürlichen Guanidinophosphorsäure (Phosphagene) in der quergestreiften Muskulatur. 1. Das physiologische Verhalten der Phosphagene. Biochem. Z. 196, 23-48

MIZELL, S. (1965) : Seasonal changes in energyreserves in the common frog, Rana pipiens. J.cell.comp.Physiol. 66, 251-258

MONOD, J., J.-P.CHANGEUX and F.JACOB (1963) : Allosteric proteins and cellular control systems. J.molecular Biol. 6, 306-329

MONOD, J., J.WYMAN and J.-P.CHANGEUX (1965) : On the nature of allosteric transition. A plausible model. J.molecular Biol. 12, 88-118

MORGAN, H.E. and A.PARMEGGIANI (1964 a) : Regulation of glycogenolysis in muscle. In: WHELAN, W.J. and M.P.CAMERON (Edtis) Control of Glykogen metabolism. Ciba Foundation Symposion p. 254-272 London: J.& A.Churchill, LTD

MORGAN, H.E. and A.PARMEGGIANI (1964b) : Regulation of glycogenolysis in muscle. III. Control of muscle glycogen phosphorylase acticity. J.biol.Chem. 239, 2440-2445

MÜNZNER, H. u. P.SCHÖNFELD (1964) : Statistische Methodenlehre II. Zusammenstellung der Vorlesung von Prof. Dr. H.MÜNZNER. Berlin, Freie Universität

MUNCH-PETERSEN, A. (1955) : Investigations of the properties and mechanism of the uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase reaction. Acta chem.Scand. 9, 1523-1536

MURPHY, T.A., and G.R.WYATT (1964) : Enzymic regulation of trehalose and glycogen synthesis in the fat body of an insect. Nature (Lond.) 202, 1112-1113

MURPHY, T.A., and G.R.WYATT (1965) : The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. J.biol.Chem. 240, 1500-1508

NARAHARA, H.T., P.ÖZAND and C.F.CORI (1960) : Studies of tissue permeability. VII. The effect of insulin on glucose penetration and phosphorylation in frog muscle. J.biol.Chem. 235, 3370-3378

NEILAND, K.A. and B.T.SCHEER (1953) : The influence of fasting and of sinus gland removal on body composition of Hemograpsus nudus. Physiologia comp.Oecol. 3, 321-326

OZAND, P., H.T.NARAHARA (1964) : Regulation of glycolysis in muscle. III. Influence of insulin, epinephrine and contraction on phosphofructokinase activity in frog skeletal muscle. J.biol.Chem. 239, 3146-3152

PANEK, A. and N.O.SOUZA (1964) : Purification and properties of bakers' yeast trehalase. J.biol.Chem. 239, 1671-1673

PARMEGGIANI, A. and H.E.MORGAN (1962) : Effect of adenine nucleotides and inorganic phosphate on muscle phosphorylase activity. Biochem.biophys.Res.Comm. 9, 252-256

PETTE, D. (1965) : Plan und Muster im zellulären Stoffwechsel. Naturwissenschaften 52, 597-616

PETTE, D., and H.W.HOFER (1965) : Some properties of fructose-6-phosphate-kinase from rabbit skeletal muscle. In: CHANCE, B., R.W.ESTABROOK and J.R. WILLIAMSON (Edits) Control of Energy Metabolism. p. 71-79 New York, London: Academic Press

PFANZAGL, J. (1966) : Allgemeine Methodenlehre der Statistik II. Sammlung Göschen, Band 747/747a Berlin: Walter de Gruyter & Co

POSNER, J.B., R.STERN and E.G.KREBS (1965) : Effects of electrical stimulation and epinephrine on muscle phosphorylase, phosphorylase b kinase, and adenosine-3',5'-phosphate. J.biol.Chem. 240, 982-985

RALL, T.W. and E.W.SUTHERLAND (1958) : Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J.biol.Chem. 232, 1065-1076

RENAUD, L. (1949) : Le cycle des réserves organiques chez les Crustacés Décapodes. Ann.Inst.océanogr. (Paris) N.S. 24, 259-357

ROBERTSON, J.D. (1961) : Studies of the chemical composition of muscle tissue. II The abdominal flexor muscle of the lobster Nephrops norvegicus (L.). J.exp.Biol. 38, 707-728

ROSELL-PEREZ, M., J.LARNER (1964) : Studies on UDPG: -1,4 glucan -4 glucosyltransferase. VI. Specificity and struktural requirements for the activator of the D form of the dog muscle enzyme. Biochemistry 3, 773-778

+SAITO, S. (1960) : J.Biochem. 48, 1I1-109 Zit. n. GUSSIN, A.E.S. and G.R.WYATT (1965)

SAITO, S. (1963) : Trehalose in the body of the silkworm, Bombyx mori. J.Insect.Physiol. 9, 509-519

SCHNEIDER, W.C. (1959) : Mitochondrial metabolism. In: Adv.Enzymol. 21, 1-72

SARAYDARIAN, K., W.F.H.M.MOMMAERTS, A.WALLNER and R.J.GUILLORY (1961) : An estimation of the true inorganic phosphate content of frog sartorius muscle. J.biol.Chem. 236, 2071-2075

SIE, H.-G., A.HABLANIAN and W.H.FISHMAN (1964) : Solubilization of mouse liver glycogen synthetase and phosphorylase during starvation glycogenolysis and its reversal by cortisol. Nature (Lond.) 201, 393-394

SMITH, D.S. (1966) : The organization and function of the sarcoplasmic reticulum and T-system of muscle cells. Prog.Biophys.mol.Biol. 16, 109-142

SPECK, U. (1967) : Spektrum und Haushalt der Kohlenhydrate des Flußkrebses Orconectes limosus Rafinesque. Diss. Berlin

SUTHERLAND, E.W. (1951) : The effect of the hyperglycemic factor and epinephrine on liver and muscle phosphorylase. In: McELROY, W.D. and B.GLASS (Edits) Phosphorus Metabolism. Vol. 1, 53-61 Baltimore : The Johns Hopkins Press

SUTHERLAND, E.W. and G.A.ROBISON (1966) : Metabolic effects of catecholamines. A. The role of cyclic-3'5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. Pharmac.Rev. 18, 145-161

SCHEER, B.T. and M.A.R.SCHEER (1951) : Blood sugar in spiny lobster. Part 1 of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. Physiologia comp. Oecol. 2, 198-209

SCHEER, B.T. (1957) : The hormonal control of metabolism in decapod crustacians. In: SCHEER, B.T.(Edit.), Recent Advances in Invertebrate Physiology. p. 213-227 Eugene: Univ. of Oregon Publ.

SCHMID, R., P.W.ROBBINS and R.R.TRAUT (1959) : Glycogen synthesis in muscle lacking phosphorylase. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A. 45, 1236-1240

SCHWABE, C.W., B.T.SCHEER, and M.A.R.SCHEER (1952) :
The molt cycle of Panulirus japonicus. Part II of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. Physiologia comp.Oecol. 2, 310-320

STEIN, M.W. (1955) : Phosphohexoisomerases from muscle. In: COLOWICK, S.P., and N.O. KAPLAN (Edits), Methods in Enzymology. Vol. 1, 299-306 New York: Academic Press

STEINER, D.F., V.RAUDA, and R.H.WILLIAMS (1961) : Effects of insulin, glucagon, and glucocorticoids upon hepatic glycogen synthesis from uridine diphosphate glucose. J.biol.Chem. 236, 299-304

STEINER, D.F. (1964) : Mechanisms of regulation of hepatic glycogen synthesis. Nature (Lond.) 204, 1171-1173

STEELE, J.E. (1963) : The site of action of insect hyperglycemic hormone. Gen.comp.Endocrinol. 3, 46-52

STEVENSON, E., and G.R.WYATT (1964) : Glycogen phosphorylase and its activation in silkmoth fat body. Arch.Biochem.Biophys. 108, 420-429

TRAUT, R.R., and F.LIPMANN (1963) : Activation of glycogen synthetase by glucose-6-phosphate. J.biol.Chem. 238, 1213-1221

TRIVELLONI, J.C. (1960) : Biosynthesis of glucosides and glycogen in the locust. Arch.Biochem.Biophys. 89, 149-150

URICH, K. (1958) : Über die Funktion des Regenwurm-Chloragogs, insbesondere über Fettresorption und Fettspeicherung bei Lumbricus terrestris L.. Z.vergl.Physiol. 41, 342-363

URICH, K. (1961) : Mitteldarmdrüsen und Insektenfettkörper als Zentralorgane des Stoffwechsels. Erg.Biol. 24, 156-184

URICH, K. (1964) : Die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse im Metazoenorganismus. 1.Internationales Symposion über Probleme der quantitativen Biologie des Stoffwechsels. Helgoländer wiss.Meeresunters. 9, 150-157

VARDANIS, A. (1963) : Glycogen synthesis in the insect fat body. Biochim.biophys.Acta 73, 565-573

VERNBERG, F.J. (1959) : Studies on the physiological variation between tropical and temperate zone fiddler crabs of the genus Uca. II. Oxygen consumption of whole organisms. Biol.Bull.mar.biol.Lab.Woods Hole 117, 163-184

VILLAR-PALASI, C., and J.LARNER (1960 a) : Uridine-diphosphate glucose pyrophosphorylase from skeletal muscle. Arch.Biochem.Biophys. 86, 61-66

VILLAR-PALASI, C., and J.LARNER (1960 b) : Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle. Biochim.biophys.Acta 39, 171-173

VILLAR-PALASI, C., and J.LARNER (1960 c) : Levels of activity of the enzymes of the glycogen cycle in rat tissues. Arch.Biochem.Biophys. 86, 270-273

VILLAR-PALASI, C., and J.LARNER (1961) : Insulin treatment and increased UDPG-glycogen transglucosylase activity in muscle. Arch.Biochem.Biophys. 94, 436-442

WANG, D.-H., and B.T.SCHEER (1963) : UDPG-glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean tissues. Comp.Biochem.Physiol. 9, 263-274

+ WARBURG, O. u. W.CHRISTIAN (1936) : Pyridin, der Wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungs-fermenten (Pyridinnucleotide). Biochem.Z. 287, 291-328

WEBER, E. (1961) : Grundriss der biologischen Statistik. Jena: VEB Gustav Fischer

WEBER, G., R.L.SINGHAL, N.B.STAMM, M.A.LEA, and E.A. FISCHER (1965) : Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes glucokinase, phosphofructo-kinase,pyruvatkinase. In: Advanzes in Enzyme Regulation 4, 59-81

McWHINNIE, M.A., and S.P.N.SALLER (1960) : Analysis of blood sugars in the crayfish Orconectes virilis. Comp.Biochem.Physiol. 1, 110-122

McWHINNIE, M.A., and R.J.KIRCHENBERG (1962) : Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermoult cycle. Comp.Biochem.Physiol. 6 117-128

McWHINNIE, M.A., and A.S.CHUA (1964) : Hormonal regulation of crustacean tissue metabolism. Gen.comp.Endocrinol. 4, 624-633

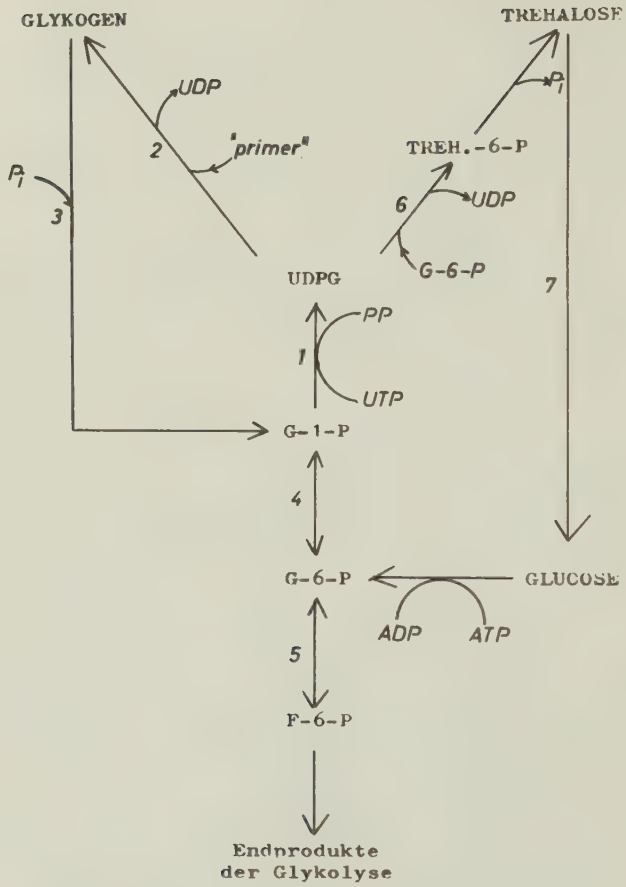
WILLIAMS, B.J., and S.E.MAYER (1965) : Glycogen synthetase of heart muscle: Effects of hormones . Fed.Proc. 24, 151

WILLIAMSON, J.R. (1965) : Metabolic control in the perfused rat heart. In: CHANCE, B., R.W.ESTABROOK, and J.R.WILLIAMS (Edits) Control of Energy Metabolism.p. 333-346. New York,London: Academic Press

WYATT, G.R.,and G.F.KALF (1957) : The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbo-hydrates. J.gen.Physiol. 40, 833-847

ZACHAR, J., and M.HENCEK (1965) : Intracellular water and density of single muscle fibres in the crayfish. Physiologia bohemoslov 14 1- 11 Zit.n. BA 46, 77814

ZEBE, E.C., and W.H.McSHAN (1959) : Trehalase in the thoracic musclesof the woodroach,Leucophaea maderae. J.cell.comp.Physiol. 52, 21-29



1 UDPG-Pyrophosphorylase
2 Glykogen-Synthetase
3 Glykogen-Phosphorylase
4 Phosphoglucomutase
5 Hexosephosphat-Isomerase
6 Trehalosephosphat-Synthetase
7 Trehalase

Anhang: Enzyme des Glykogen- und Trehalosestoffwechsels

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Urich am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Ich bin Herrn Prof. Dr. Urich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut, für die Anregung zu dieser Arbeit, für die großzügige Förderung sowie für die Kritik bei der Abfassung dieser Dissertation sehr zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 4. August 1938 wurde ich als älteste Tochter des Journalisten Josef Wilkens und seiner Ehefrau Gerda, geb. Fritsche in Berlin geboren. 1939 übersiedelten meine Eltern nach Hamburg.

Während der Evakuierung kam ich 1945 auf die Grundschule in Salzhausen, besuchte seit 1946 die Grundschule in Hamburg, seit 1951 das Bertha-Lyzeum und seit 1955 den naturwissenschaftlichen Zweig der Emilie-Wüstenfeld-Schule, die ich 1958 mit dem Abitur verließ.

Im April 1958 begann ich eine Lehre als Laborantin am Institut für Physiologische-Chemie der Universität Hamburg (Prof.Dr.Kühnau).

Im Wintersemester 1959/1960 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Hamburg und legte 1963 die Diplom-Vorprüfung ab. Im Wintersemester 1963/64 setzte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin fort. Seit 1965 bin ich Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. Klaus Urich am II. Zoologischen Institut der Freien Universität.

Ich bin seit August 1964 mit dem Rechtsanwalt Werner Jantzen verheiratet.